

## Tesis Doctoral

# Mecanismos de detección visual y evitación de colisiones en un nuevo modelo experimental, el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*

Oliva, Damián Ernesto

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Oliva, Damián Ernesto. (2010). Mecanismos de detección visual y evitación de colisiones en un nuevo modelo experimental, el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Oliva, Damián Ernesto. "Mecanismos de detección visual y evitación de colisiones en un nuevo modelo experimental, el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Mecanismos de detección visual y evitación de colisiones  
en un nuevo modelo experimental, el cangrejo  
*Chasmagnathus granulatus*.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área:  
Ciencias Biológicas

Damián Ernesto Oliva

Director y Consejero de Estudios: Dr. Daniel Tomsic

Buenos Aires, Fecha: 23 de Febrero 2010

**Título:** Mecanismos de detección visual y evitación de colisiones en un nuevo modelo experimental, el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*.

## **Resumen**

Los artrópodos, en especial los insectos y crustáceos, son animales muy activos que poseen repertorios comportamentales altamente complejos, la mayoría de los cuales se encuentran guiados por la información visual. Así, la interacción entre el sistema visual y motor es fundamental en una variedad de funciones como por ejemplo: tener buenos sistemas de navegación, escape, detección e identificación de predadores, presas y coespecíficos, etc. Dentro de esta gama de comportamientos, esta tesis estudia el funcionamiento del sistema de escape del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* frente a los estímulos de colisión. Para esto, desarrollamos un dispositivo que mide la respuesta locomotora del animal cuando se aplican estímulos visuales generados por computadora. Con este dispositivo caracterizamos la respuesta de escape de *Chasmagnathus* a estímulos que simulan colisiones de objetos que se acercan al cangrejo a velocidad constante. Medimos la respuesta motora del animal variando distintos parámetros del estímulo como ser: la velocidad de aproximación, el tamaño del objeto, la dirección de acercamiento y el contraste respecto al fondo. Encontramos que la respuesta de escape es compleja y está compuesta por una secuencia de fases encadenadas, es altamente direccional y la velocidad del animal es controlada instantáneamente por la entrada visual. Analizamos el comienzo del escape y encontramos una variable que lo predice.

Luego de la caracterización comportamental, pasamos a describir la respuesta de las Neuronas Gigantes de la Lóbula (neuronas LG). Mostramos que las neuronas MLG1 y MLG2 (Monostratified Lóbula Giant Neuron 1 y 2) y BLG1 (Biestratified Lóbula Giant Neuron 1) responden preferencialmente a estímulos que representan colisiones de objetos y codifican la dinámica de expansión temporal de los estímulos. Mostramos que la tasa de disparo de las neuronas MLG1 y BLG1 codifican la velocidad angular del estímulo y que las neuronas MLG2 codifican la aceleración angular. Por otro lado, las neuronas BLG2 (Biestratified Lóbula Giant Neuron 2), codifican una información cualitativamente distinta a las tres neuronas anteriores respondiendo principalmente el comienzo y la finalización de la expansión.

Una vez medidas las respuestas comportamentales y neuronales, analizamos la posibilidad de predecir el comienzo del escape en función de la actividad de las neuronas LG y encontramos un criterio que usa información de dos neuronas que correlaciona con el mismo.

Finalmente, desarrollamos un modelo simple que usando la tasa de disparo de las neuronas LG, predice la velocidad de los animales durante el escape.

**Palabras claves:** visión, detección de colisiones, patrones motores, comportamiento, electrofisiología, registros intracelulares.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido previamente presentados en dos publicaciones:

Oliva, D. , Medan, V. & Tomsic, D. (2007) Escape behaviour and neuronal responses to looming stimuli in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae). The Journal of Experimental Biology 210, 865-880.

Medan, V., Oliva, D. & Tomsic, D. (2007) Characterization of Lobula Giant neurons responsive to visual stimuli that elicit escape reactions in the crab *Chasmagnathus*. Journal of Neurophysiology 98, 2414-2428.



# Índice

## **Capítulo 1 – Introducción General**

- 1.1. Comportamientos visuomotores de artrópodos.
  - 1.1.1- Clasificación de Land y Nilsson de los comportamientos visuales simples.
  - 1.1.2- Sistemas de detección y evitación de colisiones.
  - 1.1.3- Mecanismos de toma de decisión en el cangrejo *Uca* en su ambiente.
- 1.2- Sistema visual de invertebrados y en especial de *Chasmagnathus*.
  - 1.2.1- Información contenida en la luz y procesamiento en los fotorreceptores.
  - 1.2.2- Neuropilos visuales en artrópodos.
  - 1.2.3- Neuronas detectoras de colisión.
    - 1.2.3.1 - Las neuronas LGMD y DCMD de la langosta.
- 1.3 - La lóbula de *Chasmagnathus* y sus neuronas gigantes.

**Resumen de antecedentes descriptos que motivaron esta tesis.**

**Objetivos específicos.**

## **Capítulo 2 - Materiales y Métodos Generales. Desarrollo de un dispositivo experimental para la medición de comportamientos visuomotores en *Chasmagnathus granulatus*.**

- 2.1- Animales.
- 2.2- Dispositivo para estimular y medir la respuesta visuomotora de *Chasmagnathus granulatus*.
  - 2.2.1- Medición de la actividad locomotora.
  - 2.2.2- Estimulación visual y sincronización con la medición de la actividad locomotora.
- 2.3- Estímulos utilizados.
  - 2.3.1- Estímulos que se acercan a velocidad constante.
  - 2.3.2- Estímulos que se alejan a velocidad constante.
  - 2.3.3- Relación entre el tiempo a la colisión y las variables angulares.
  - 2.3.4- Otros estímulos visuales utilizados.
- 2.4- Setup de electrofisiología.
- 2.5- Análisis estadístico.
- Apéndice 2.A - Comparación de un estímulo real y uno simulado.
- Apéndice 2.B – Calibración de intensidad luminosa.

### **Capítulo 3 - Descripción de la respuesta comportamental a estímulos de colisión.**

3.1- Fases en la dinámica y direccionalidad del escape.

3.2 – Estimulación repetida.

3.2.1- Consistencia de la respuesta en un mismo animal y entre distintos animales.

3.3- Respuestas a estímulos que representan objetos que se acercan (estímulos loomings o de expansión), que se alejan (estímulos receding o de contracción) y oscurecimientos graduales.

3.4 – Efecto de la dirección en que se acerca el objeto sobre la respuesta de escape.

3.5 - Primera evidencia sobre el control de la velocidad de escape.

### **Capítulo 4 - Respuesta comportamental a distintas dinámicas de aproximación.**

4.1- Respuesta comportamental a distintas dinámicas de aproximación.

4.2- Curso temporal de la respuesta.

4.3 - *¿Qué variable óptica predice el comienzo del escape?*

4.4 – Estimación del tiempo de retraso entre una toma de decisión y la salida motora.

4.5– Medición del tiempo de retraso entre la toma de decisión y la ejecución del escape.

4.6 - *¿Que variable predice el freezing de los animales que se encontraban caminando antes de comenzar la expansión?*

4.7- Regulación de la velocidad de escape.

Apéndice 4.A – Regulación de velocidad en registros individuales.

### **Capítulo 5 - Codificación de las neuronas LG de los estímulos de colisión**

5.1- Antecedentes.

5.1.1- Criterio para la clasificación de las neuronas LG .

5.2- Respuesta de las LG a distintos estímulos visuales.

5.2.1- Las neuronas gigantes de la lóbula responden preferencialmente a los estímulos de movimiento.

5.2.2- Campos receptivos de las neuronas gigantes de la lóbula tipo MLG1, MGL2, BLG1 y BGL2.

- 5.2.3- Respuestas a estímulos que representan objetos que se acercan (estímulos loomings o de expansión), que se alejan (estímulos receding o de contracción), que se mueven tangencialmente y a oscurecimientos graduales.
- 5.3- Caracterización de la respuesta de las neuronas gigantes de la lóbula a distintas dinámicas de aproximación.
- 5.3.1- Registros de neuronas MLG1, MLG2, BLG1 y BLG2 a distintas dinámicas de aproximación.
- 5.3.2- Codificación visual de MLG1, MLG2, BLG1 durante la fase de escape.
- 5.3.3- Tiempo de defasaje entre la entrada visual y la respuesta neuronal.
- 5.3.4- Ajuste de la tasa de disparo a un modelo simple de una variable.
- 5.3.5- Discusión Rind-Gabbiani

## **Capítulo 6 – Relación entre la actividad neuronal y el escape de *Chasmagnathus* a los estímulos loomings.**

- 6.1- Relación entre la actividad neuronal y el comienzo del escape.
- 6.1.1- Existencia de un criterio de comienzo del escape utilizando información de un tipo neuronal.
- 6.1.2- Codificación de la neurona BLG2 y su relación con los otros tipos neuronales en el comienzo del escape.
- 6.2- Relación entre la actividad neuronal y la velocidad del animal durante la fase de escape.
- 6.2.1- Modelo propuesto para la relación entre la actividad de las LG y la salida comportamental del animal durante el escape.
- 6.2.2- Interpretación del modelo de escape como un sistema de control.
- 6.3- Resumen del modelo

### **Conclusiones.**

### **Discusión.**

### **Bibliografía.**

# Capítulo 1 - Introducción

## 1.1. Comportamientos visuomotores de artrópodos.

### 1.1.1- Clasificación de Land y Nilsson de los comportamientos visuales simples.

Los artrópodos, en especial los insectos y crustáceos, son animales muy activos que poseen repertorios comportamentales altamente complejos, la mayoría de los cuales se encuentran guiados por la información visual.

Así, la interacción entre el sistema visual y motor es fundamental en una variedad de funciones como por ejemplo: tener buenos sistemas de navegación, detección e identificación de predadores, presas y coespecíficos, etc.

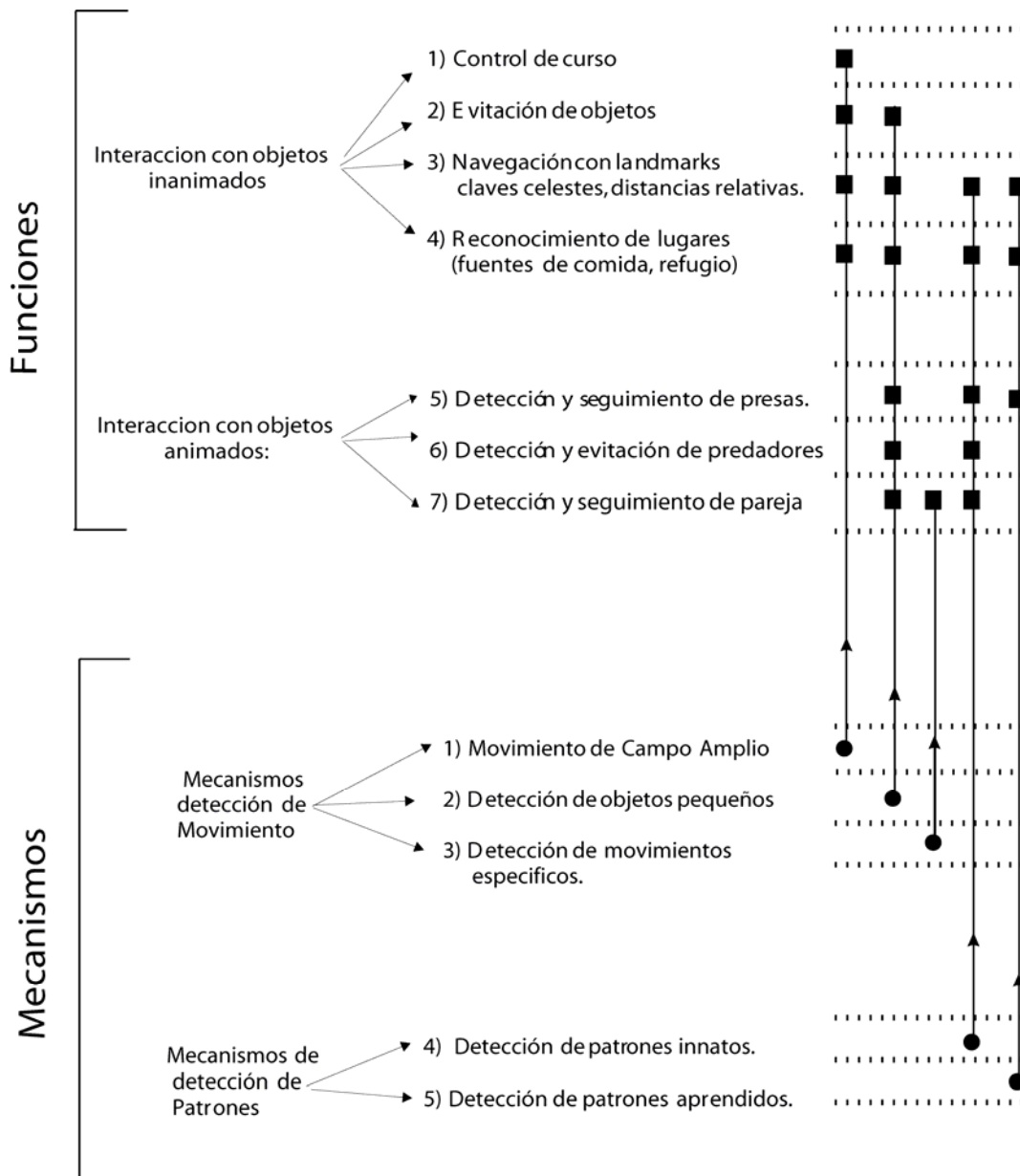
Land y Nilsson (2006) realizaron una clasificación de distintos comportamientos visuomotores que son utilizados por los artrópodos en su ambiente natural (figura 1.1), separando las *funciones* (tareas a resolver por el animal) de los *mecanismos* (el substrato fisiológico, señal física y codificación neuronal). Esta clasificación tiene la ventaja de permitirnos realizar estudios comparativos para ir resumiendo cuales son los módulos comportamentales básicos y sus posibles implementaciones neurales.

Si bien las funciones de la figura 1.1 parecen obvias a primera vista, uno toma conciencia de su complejidad cuando se trata de construir máquinas que resuelvan estas tareas en un ambiente real y que lo hagan con igual capacidad que los animales.

Pensemos por ejemplo en las abejas. Estos insectos pueden viajar distancias de kilómetros entre su panal y la fuente de comida sin perderse en el camino de ida o vuelta. Deben guiarse hasta la fuente y aterrizar suavemente sin colisionar sobre la flor (Srinivasan 2006). Usan vías de color o simetrías para reconocer fuentes alimenticias y guiarse para llegar a ellas (Horridge 2006). Además pueden usar el patrón de polarización del cielo para informar a otras abejas de la ubicación de una fuente de comida. Lo más sorprendente es que todas estas tareas complejas, se resuelven con un cerebro del orden de tan solo un millón de neuronas.

Otro ejemplo ilustrativo es el del cangrejo *Uca vomeris* (Land&Layne 1995a,b , Hemmi&Zeil 2006). Este animal realiza excursiones de forrajeo en los cuales abandona temporariamente su cueva. Para regresar a ella utiliza el sistema conocido como de navegación por estima (dead reckoning) que consiste en estimar la posición actual en base a las posiciones previas. Para esto no utiliza la información visual sino que obtiene la información de la distancia recorrida y desvíos efectuados, a partir de integrar la información motora generada durante la excursión. De este modo es capaz de resolver el vector resultante que lo conduce directamente a volver a su cueva. Pero además, para evitar que un intruso ocupe su cueva durante las excursiones de forrajeo, el cangrejo

hace una evaluación de la distancia entre el intruso y la cueva. Lo interesante es que la medición de la distancia entre esos dos objetos se obtiene a partir de combinar la información visual de la posición del intruso, con la información no visual de la distancia a la que se encuentra su cueva. Esta habilidad requiere de un elaborado proceso de computo (Hemmi y Zeil 2003).



**Figura 1.1:** Clasificación de algunos comportamientos visuomotores en invertebrados y algunos mecanismos básicos necesarios para generarlos. Para más detalles ver (Land y Nilsson 2006).

### 1.1.2- Sistemas de detección y evitación de colisiones:

Dentro del abanico de comportamientos visuomotores (ver figura 1.1), los relacionados con la evitación de colisiones tienen, por su ubicuidad e importancia biológica, un interés particular. Así, todos aquellos animales que se desplazan activamente, sea volando, caminando o nadando, poseen sistemas que les permiten anticipar la colisión con los obstáculos que se hallan en su curso de desplazamiento. Las respuestas para evitar colisiones van desde las maniobras de aterrizaje de un animal volador sobre una superficie (Srinivasan 2000), hasta el escape de una presa ante el ataque de un predador. En el primer caso, la información visual de que hace uso el animal para efectuar un aterrizaje adecuado está dado por un flujo óptico de campo amplio (por ejemplo el movimiento de la textura del suelo), mientras que en el segundo, la información estará dada por la expansión de un objeto sobre un fondo. Esta tesis se centrará en el estudio de colisiones del segundo tipo, pero en esta sección exploraremos los casos estudiados con una visión más general.

Debido a la importancia de la evitación de colisiones en la supervivencia, los animales *deben tener sistemas confiables y rápidos* para detectarlas. En el caso particular de las respuestas de evitación al ataque de un predador, estas respuestas pueden variar desde una estrategia de freezing (inmovilidad para pasar inadvertido ante el predador) hasta un escape regulado para alejarse del mismo. El animal debe decidir en función del estímulo que respuesta producir y como veremos, este proceso de toma de decisión puede ser muy complejo y depender de muchos factores.

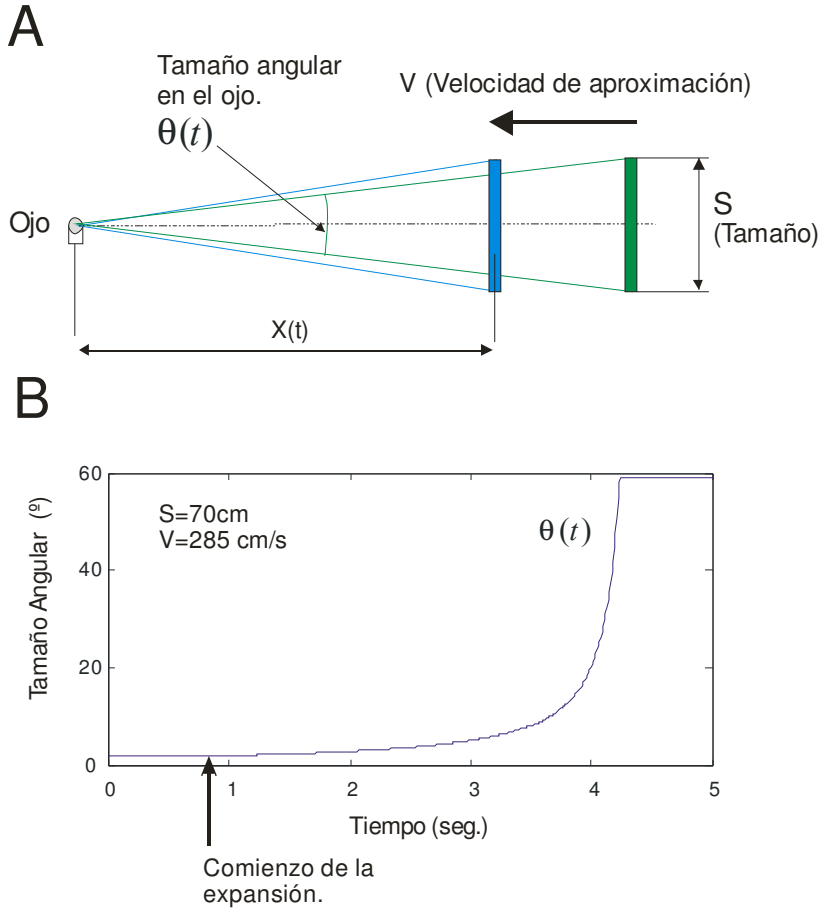
Sin embargo, consideramos que en comportamientos fundamentales como este, una vez que el animal decide que un objeto es peligroso, *producirá una respuesta de evitación estereotipada y controlada por un circuito neuronal simple*, para generar como dijimos, un sistema confiable y rápido.

Los estudios del comportamiento de evitación de colisiones en el laboratorio, por lo común se realizan con estímulos visuales que simulan objetos que se aproximan al animal a velocidad constante  $V$  (ver figura 1.2). El tamaño del objeto suele definirse con la letra  $S$  por *Size* del ingles. La distancia entre el ojo del animal y el objeto es  $x(t)$  y el ángulo subtendido sobre el ojo es  $\theta(t)$ .

Dependiendo de la velocidad de acercamiento, el tamaño del objeto y su distancia, la imagen de un objeto que se aproxima generará diferentes dinámicas de expansión sobre la retina del observador. Entre los parámetros de la imagen que podrían ser utilizados por el observador para decidir su respuesta están: el tamaño angular  $\theta(t)$  y sus derivadas temporales como la velocidad angular  $\dot{\theta}(t)$  o aceleración angular  $\ddot{\theta}(t)$ . Además, utilizando estas, puede calcular otras variables de interés como por ejemplo el incremento angular desde el comienzo de la expansión

$\Delta\theta(t) = \theta(t) - \theta(t=0)$  o el tiempo restante a la colisión  $t_c$  que se puede obtener del siguiente modo  $t_c = \text{sen}(\theta)/\dot{\theta}$  y que podemos aproximar por  $t_c \approx \theta/\dot{\theta}$  si  $\theta(t)$  es pequeño.

De esta manera denominaremos a cualquiera de estas variables como  $Z(t)$ . En distintos animales puede referir a parámetros y valores distintos de la imagen. Como dijimos estarán codificadas en el sistema nervioso del animal y controlarán las respuestas a los estímulos de colisión.



**Figura 1.2:** Estimulo que se acerca en trayectoria de colisión. (A) Un objeto de tamaño S se acerca a velocidad constante V, hacia el animal. (B) Si  $S=70\text{cm}$  y  $V=285\text{cm/s}$  el objeto subtende un ángulo  $\theta(t)$  en el ojo del animal que aumenta en función del tiempo como se indica en el grafico.

Existen muchos trabajos que estudian los mecanismos de evitación de colisiones a nivel comportamental. Para simplificar su exposición, clasificamos los comportamientos estudiados en la bibliografía en dos tipos de sistemas: Sistemas de *respuesta umbral o balística* y Sistemas *respuesta controlada* (ver figura 1.3).

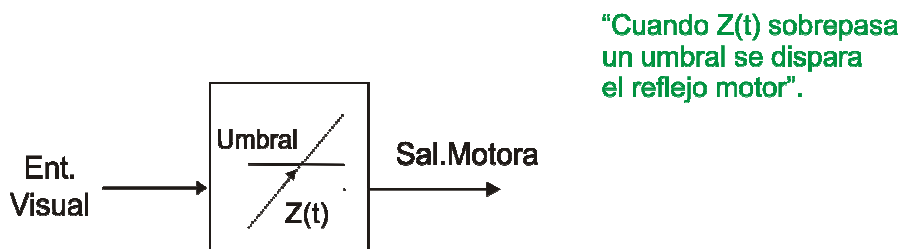
En el caso de los *Sistemas de respuesta umbral o balística* el animal codifica en su sistema nervioso una variable interna y cuando esta sobrepasa un valor umbral, despliega un comportamiento estereotipado (por ejemplo adquirir una postura de protección, correr a máxima

velocidad, etc). Estos sistemas serían similares a los que generan un patrón fijo de comportamiento que es disparado por un estímulo llave, es decir, serían respuestas del tipo *todo o nada*.

En el caso de los *Sistemas de respuesta controlada* el animal posee una variable de error que mide la diferencia entre el valor de entrada  $Z_{Entrada}$  y el valor objetivo  $Z_{Objetivo}$  (ver figura 1.3.B). La salida motora del animal intenta disminuir el error. Para esto, compara continuamente el valor de entrada con el valor objetivo y computa un  $Error = Z_{Entrada} - Z_{Objetivo}$ . Además, pueden haber distintas perturbaciones externas al animal (por ejemplo por el movimiento del predador) que alteran el valor de entrada.

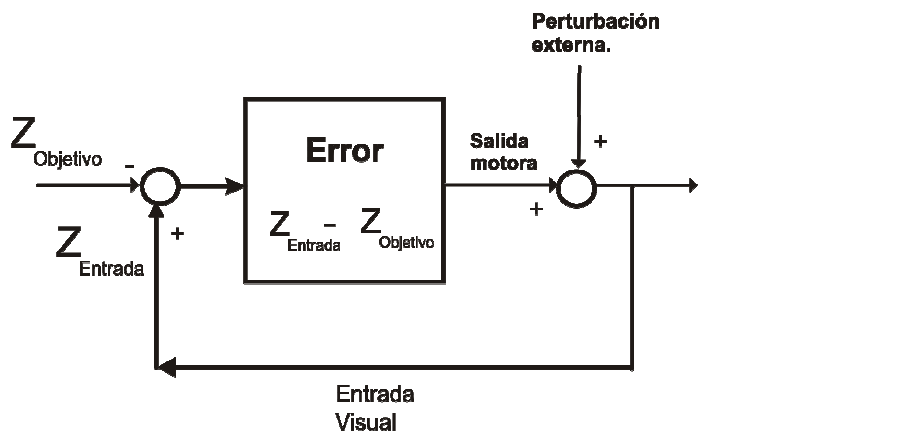
A

### Sistema Balístico



B

### Sistema Controlado



**Figura 1.3:** Clasificación de los comportamientos de evitación de colisiones. Dividimos estos sistemas en balísticos (A) y controlados (B). En los sistemas balísticos el animal tiene una variable interna que cuando sobrepasa un valor umbral, el animal despliega una respuesta estereotipada. En los sistemas controlados o regulados, el animal tiene un valor objetivo y quiere mantener a la variable  $Z_{Entrada}(t)$  cerca de su valor objetivo  $Z_{Objetivo}$ . Para lograr esto compara continuamente la variable de entrada con el valor objetivo y computa un error. Finalmente su salida motora es tal que disminuye el error. Luego de la salida motora del animal pueden existir perturbaciones que el animal no puede controlar.



## Ejemplos de comportamientos de evitación de colisiones.

En la tabla 1.2 mostramos los principales resultados comportamentales en evitación de colisiones. Organizamos las respuestas según si son balísticas o controladas y también en función de la variable interna que controla el comportamiento, como por ejemplo: Incremento angular  $\Delta\theta(t)$ , velocidad angular  $\dot{\theta}(t)$  o variables obtenidas a partir de ellas como ser el tiempo a la colisión  $t_c$  o la integración de flujo óptico.

	Tiempo a la colisión	Integración Flujo óptico	Tamaño Angular	Incremento Angular	Velocidad Angular
Respuesta Balística	Wagner 1982 (ML) Lee 1976 (PL)	Tammero y Dickinson 2002 (ML)	Fotowat 2007 (LL)	Glantz 74 (CrL) Nalbach 90 (CE)	Hemmi 2005 (CE)
Respuesta Controlada	Lee1980 (HL)				Land 95II (CE) Srinivasan 2000 (AL) Ruffier 2005 (BM)

**Tabla 1.2: Clasificación de los comportamientos de evitación de colisiones encontrados en la bibliografía.** Indicamos animales utilizados H: Humanos, M: Mosca, A: Abeja, C: Cangrejo, Cr: Crayfish, L:Langosta y la metodología de trabajo L: Laboratorio, E: Ambiente Natural, BM: Biomimética.

Ahora pasamos a detallar las conclusiones principales de los trabajos de la tabla 1.2.

### Sistemas balísticos

*Variables relacionadas con el tamaño angular:*

Glantz (1974), estudia el despliegue de quelas en crayfish cuando se acercan objetos en trayectoria de colisión frontal. En este trabajo se llega a la conclusión de que el animal levanta las quelas cuando el incremento angular del objeto  $\Delta\theta(t) = \theta(t) - \theta(t = 0)$  es de 8 grados. Este umbral es independiente de la velocidad angular del movimiento de los bordes del objeto.

Nalbach (1990), realiza un estudio de campo con el cangrejo *Heloecius Cordiformis*. Se acercan objetos en trayectoria de colisión y se muestra que la respuesta esta formada por dos fases: Cuando el tamaño angular del objeto se incrementa en aproximadamente 8°, el animal se acerca a la cueva y cuando sobrepasa los 12° el animal ingresa a la misma. Estas dos umbrales comportamentales son independientes de la velocidad.

Fotowat y Gabbiani (2007) estudian la respuesta de la langosta a los objetos que se acercan presentando simulaciones por computadora. Este animal produce una respuesta de salto cuando el ángulo subtendido por el objeto sobrepasa 60 grados, no importando la velocidad de la expansión ni su aceleración. Además antes del salto la respuesta está compuesta de varias fases en la tensión de los músculos de las patas. Todas estas fases de preparación motora se despliegan a valores fijos del tamaño angular independientemente de la velocidad.

No obstante, cabe mencionar que debido a que utilizaron un único tamaño del objeto, los animales podrían en realidad estar respondiendo a un  $\Delta\theta$  en lugar de un tamaño particular en cada una de las fases.

#### *Variables relacionadas con el tiempo a la colisión*

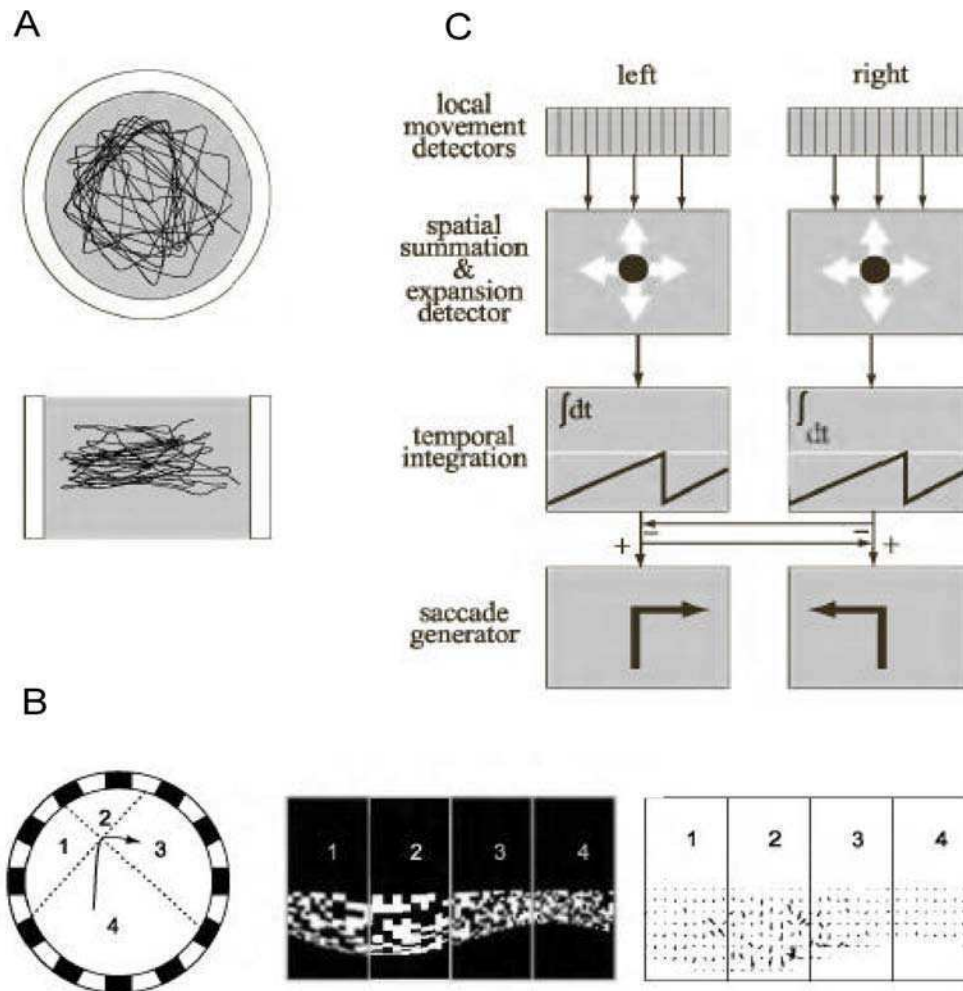
Wagner (1982) estudia el aterrizaje de moscas sobre una esfera. Se muestra que las moscas extienden sus patas cuando el tiempo a la colisión es menor que un valor crítico.

#### *Variables espacio-temporales*

Tammero y Dickinson (2002) estudiaron el vuelo de drosófila filmando sus trayectorias dentro un cilindro (ver figura 1.4.A). Se analizaron los giros sacádicos que consisten en cambios abruptos en la dirección de vuelo de la mosca (aproximadamente de  $\pm 90^\circ$ ) antes de chocar con las paredes. Se interpretaron los resultados de este comportamiento con un modelo que integra la salida de los detectores de Reichardt (Reichardt 1986) en cuatro regiones del campo receptivo (trabajo que realizarían las neuronas tangenciales de la lóbula plate (Borst & Haag 2002 y Egelhaaf 2006)). Estas señales son sumadas temporalmente y cuando sobrepasan un umbral se producen los giros (ver figura 1.4.B y C).

Por otro lado, se estudió el reflejo de extensión de patas y los giros sacádicos cuando se simulan colisiones en distintas regiones del campo receptivo y a distintas velocidades de aproximación. Tammero y Dickinson (2005) caracterizaron detalladamente estas respuestas y vieron que la probabilidad de extender las patas aumenta para las expansiones en el frente del animal, mientras

que los giros sacádicos se producen para expansiones laterales. Además mostraron que ambos comportamientos se regulan en paralelo ya que se puede dar uno o los dos al mismo tiempo.



**Figura 1.4: Estudio del vuelo de drosófila.** (A) Dispositivo diseñado por Dickinson para estudiar el vuelo de drosófila. Consiste en un cilindro con distintos patrones de contraste en las paredes. La mosca es filmada por dos cámaras y a partir de esas filmaciones se reconstruye la trayectoria 3D del vuelo. (B) Estudio de los giros sacádicos (primer panel). Con la trayectoria medida, se calcula la imagen vista por la mosca (ver segundo panel). Esta imagen se utiliza para calcular la salida de los detectores de Reichardt, también denominados EMD (elementary motion detectors)(ver tercer panel). (C) La salida de estos se suma temporalmente en 4 regiones del campo receptivo es acumulada por cuatro integradores. Cuando se supera un umbral interno la mosca decide girar a  $-90^\circ$  o  $+90^\circ$ . Figura construida a partir de Dickinson et al. (2002).

## Sistemas con respuesta controlada:

### *Sistemas de control que utilizan la velocidad angular.*

Srinivasan et al. estudiaron los sistemas de control que evitan colisiones durante el vuelo y el aterrizaje de la abeja (Srinivasan et al. 2000, 2006). Proponen módulos simples que permiten resolver estas tareas. Los divide en: a) Control de curso, b) Control de velocidad y c) Control de aterrizaje suave.

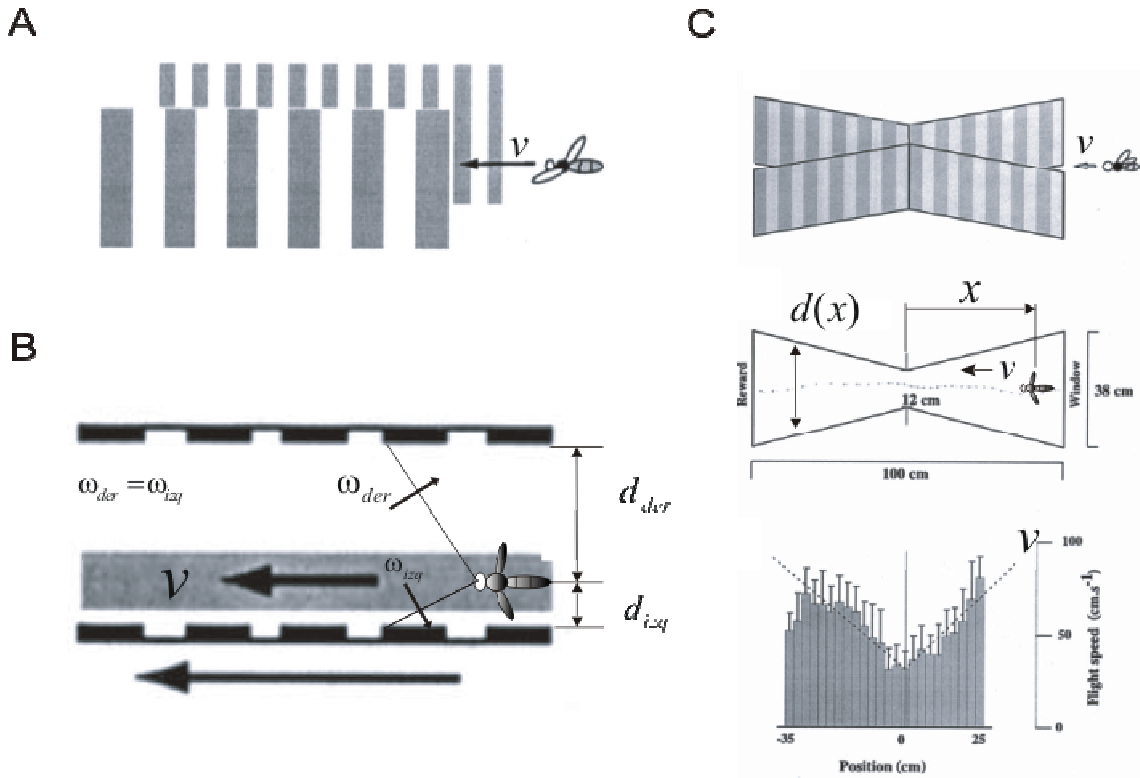
a) *Control de curso*: Cuando una abeja entra por una abertura, lo hace por el centro. Srinivasan mostró que la abeja tiene como objetivo equilibrar las velocidades angulares a izquierda y derecha. Para probar esto, puso a volar las abejas en túneles con distintos patrones de barras en las paredes (ver figura 1.5.A). Concluyó que la abeja vuela por donde las velocidades angulares  $\omega$  se equilibran  $\omega_1 = \frac{v}{d_{der}} = \omega_2 = \frac{v}{d_{izq}}$  (ver. figura 1.5.B).

b) *Control de velocidad*: Mostró que en túneles (de ancho  $d(x)$ ) que se afinan, la abeja regula su velocidad de traslación  $v$  para mantener la velocidad angular  $\omega$  constante. Entonces:

$$\omega_{obj} = \frac{v(x)}{d(x)} \approx cte, \text{ y de este modo } v(x) \approx d(x) \cdot \omega_{obj} \text{ (ver. figura 1.5.C).}$$

c) *Aterrizajes controlados* (Srinivasam et al. 2000): ¿Como hace una abeja para aterrizar en el piso con velocidad nula? Propone que el animal disminuye su velocidad manteniendo constante el ángulo de descenso y la velocidad angular del piso ( $\omega_{piso} = v / h_{piso}$  constante). De este modo, cuando llegue al piso, aterrizará con velocidad nula.

En estos trabajos de Srinivasam se ve que los comportamientos que analiza se pueden pensar como el sistema de la figura 1.3.B. En el control de curso, el error será la diferencia de velocidades angulares en los ojos derecho e izquierdo y la salida motora del animal modificará las distancias a cada pared para tratar de anular esta diferencia. En el control de velocidad y de aterrizaje, el error será la diferencia entre una velocidad angular objetivo  $\omega_{obj}$  y la velocidad angular medida por sus ojos.



**Figura 1.5: Estudio del vuelo de la abeja por Srinivasan.** (A) La abeja vuela por túneles con distintos patrones de contraste y movimientos en las paredes. (B) La abeja controla la distancia a las paredes de manera tal de igualar la velocidad angular de los puntos a izquierda y derecha. En este caso la velocidad de la pared izquierda tiene el mismo sentido que la velocidad de vuelo. Esto hace que la velocidad angular en el ojo izquierdo sea menor que en el derecho y la abeja se acerca a esa pared para equilibrar las velocidades angulares en ambos ojos. (C) La abeja varia su velocidad de traslación de manera tal de mantener la velocidad angular medida por sus ojos en un valor constante. Figura construida a partir de Srinivasan et al. (2002).

### *Sistemas de control que utilizan el tiempo a la colisión.*

El último ejemplo que analizamos se refiere a comportamientos de evitación de colisiones en humanos. En Lee (1980) se describe como los conductores de automóviles regulan la presión de frenado en una situación de posible colisión. Se predice la presión de frenado del conductor suponiendo que su objetivo es mantener la derivada del tiempo a la colisión acotada. Recordemos que un animal puede estimar el tiempo que falta para colisionar con un objeto utilizando solo variables angulares que puede medir con su ojo  $t_c \approx \theta / \dot{\theta}$ . Este investigador muestra que si nos acercamos desaceleradamente a un objeto y cumplimos  $dt_{col} / dt \geq -0.5$  entonces nunca lo alcanzaremos y esta parece ser la estrategia que utilizamos para no chocar.

De los trabajos revisados en esta sección podemos concluir que el estudio comparativo de los comportamientos de evitación de colisiones revelan dos tipos de sistemas: los *sistemas balísticos* donde la decisión de realizar un comportamiento motor es disparado cuando algún parámetro del estímulo sobrepasa el valor umbral y, por otro lado, los *sistemas controlados*, donde el animal trata de mantener al estímulo dentro de un rango de valores acotados. Mientras que el primer sistema es del tipo todo o nada, el segundo implica un mecanismo de ajuste permanente por retroalimentación.

### **1.1.3- Mecanismos de toma de decisión en el cangrejo *Uca* en su ambiente.**

En la sección anterior describimos algunos módulos comportamentales que operan en los animales y el enfoque de la descripción consistió en tratarlos de manera aislada.

En condiciones naturales, el comportamiento de un animal surge de la interacción de muchos módulos simples que operan simultanea y coordinadamente en función de las situaciones que el animal encuentra en su ambiente (Minsky M. 1986).

Un buen ejemplo de esto son los estudios con el cangrejo violinista *Uca*. Estos animales habitan ecosistemas estuarinos, viven en cuevas profundas y pueblan las playas en una alta densidad. Estos cangrejos son comúnmente presas de aves marinas y su comportamiento se ve fuertemente afectado por estos predadores.

Investigadores como Land, Zeil, Layne y Hemmi estudiaron distintos comportamientos de este animal en su ambiente natural (Land & Layne 1995 a,b, Hemmi & Zeil 2005). Según estos investigadores, los elementos fundamentales para entender muchos comportamientos de *Uca* son: la cueva, los vecinos, los predadores y la línea del horizonte.

*La cueva:* Es muy importante como lugar de protección y apareamiento. Por este motivo, cuando el animal sale a forrajear (por ejemplo en busca de alimento), cuida de que ningún vecino del mismo sexo ocupe su cueva y para esto siempre se mantienen a una distancia corta y orientado lateralmente hacia ella para ocuparla rápidamente. Además como viven en playas muy abiertas pueden ser fácilmente detectados por predadores y deben volver a esconderse antes de ser alcanzados (Hemmi y Zeil 2005 a, b).

*El horizonte:* La línea de horizonte cumple un rol fundamental en el comportamiento de estos cangrejos (Land 1995a, Layne et.al 1997, Zeil et. al 1996 y 2006). Como viven en playas desiertas y bastante planas, el horizonte es muy informativo, ya que divide dos ambientes bien diferenciados, el de la interacción con sus coespecíficos y aquel desde donde proceden los ataques de sus predadores.

*Uca* tiene ojos cuyos ángulos interomáticos se reducen (mayor resolución) en torno al ecuador. Además los ojos están montados sobre pedúnculos móviles compensan los movimientos del cuerpo del animal para mantener orientada correctamente esta zona visual de alta resolución con la línea de horizonte.

*Detección de vecinos y predadores:* Respecto al reconocimiento de objetos, se ha sugerido que la interpretación que hacen los animales de un estímulo visual en movimiento cambia con la posición de este respecto a la línea de horizonte: Un objeto encima, se interpretaría como un posible predador desencadenando comportamientos de protección. Un objeto por debajo se interpretaría como una hembra o un macho de la misma especie.

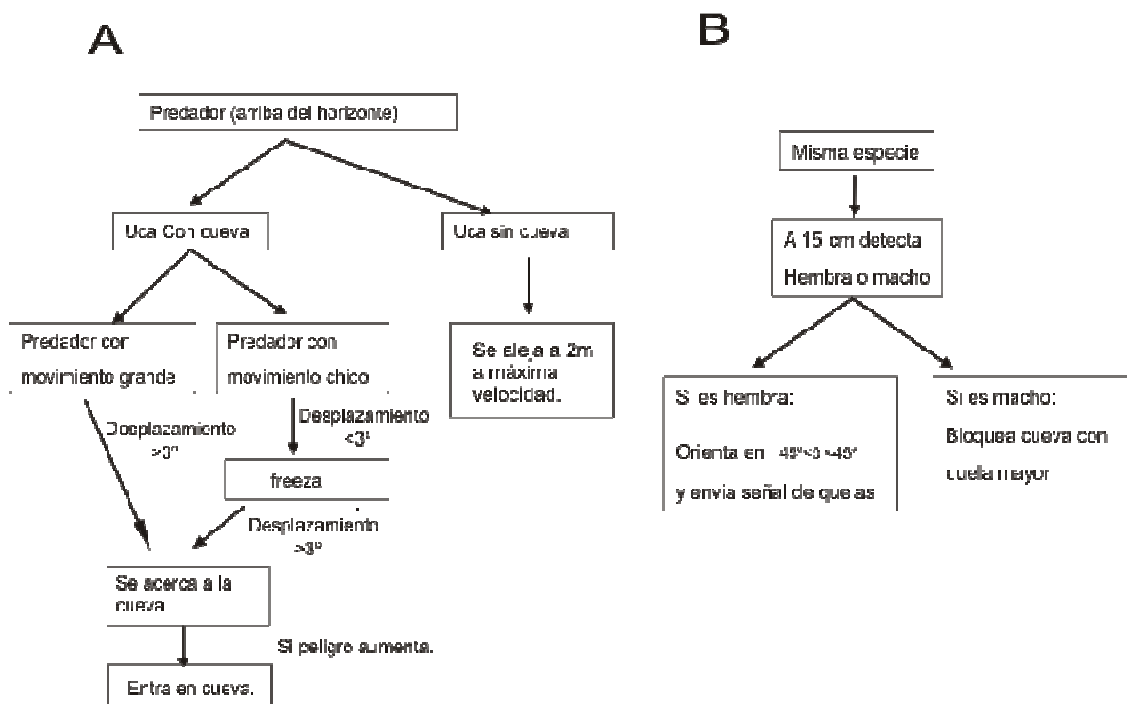
Hemmi y Zeil (2005 a, b) estudiaron el comportamiento de estos animales en su ambiente cuando se simulaban aproximaciones de predadores (utilizando bolas de tergotop movidas con hilos transparentes) con distintas trayectorias al cangrejo.

Los investigadores encontraron lo siguiente. Supongamos un ejemplo típico en que el cangrejo salió de su cueva. Si detecta un objeto por encima del horizonte con un desplazamiento pequeño (menor de  $3^\circ$ ) detiene la actividad que estaba realizando (freezing) (ver figura 1.6.A). Se interpreta que este comportamiento tiene un doble objetivo: por un lado el de pasar desapercibido, por otro lado, estabilizar el flujo visual para ganar mayor información. Si el movimiento de acercamiento del predador persiste, *Uca* decide correr hacia su cueva y detenerse cerca de la misma para seguir observando. Si la señal de peligro aumenta (por ejemplo el objeto peligroso experimenta una gran expansión) *Uca* decide entrar en la cueva.

*Costo y beneficio en la toma decisiones:* En (Hemmi & Zeil 2005) se muestra que el comportamiento está formado por un conjunto de tomas de decisiones encadenadas cada una con un beneficio y un costo determinado. Por ejemplo el freeze tiene un bajo costo que es cortar momentáneamente la actividad que estaba desarrollando (por ejemplo la alimentación) y el beneficio de pasar desapercibido. Cuando el animal decide correr hacia la cueva se gasta energía y se pierden más oportunidades, pero se gana la seguridad de estar cerca del lugar de protección. Finalmente si el animal entra en la cueva, el costo es alto porque además de perder las oportunidades que brinda el exterior, no sabe si cuando salga el predador no lo seguirá esperando fuera de la cueva (figura 1.C).

El otro caso que se ejemplifica en la figura 1.6.A (Land et.al 1995a) es que el cangrejo puede estar sin cueva cuando detecta un posible predador. En este caso usa la estrategia de girar para en caso de correr, hacerlo de costado donde desarrolla su máxima velocidad. Si la señal de peligro aumenta, *Uca* se aleja a máxima velocidad del objeto con una trayectoria opuesta a su ubicación.

Si el objeto cambia de posición, el cangrejo rapidamente modifica la dirección de su escape, indicando que se trata de un sistema de control de dirección por retroalimentación.



**Figura 1.6: Análisis de algunos comportamientos en *Uca* en el campo.** (A) Comportamiento de *Uca* frente a la imagen de un predador en situaciones de poseer o no un refugio donde escapar. (B) Reconocimiento de hembra o macho y sus comportamientos dependiendo del caso.

*Interacción con vecinos:* Otro comportamiento muy estudiado (Land et.al 1995a, Hemmi et.al 2003) está relacionado con la interacción de *Uca* con sus vecinos (figura 1.6.B). Como dijimos la cueva es muy importante y no debe ser ocupada por otro macho. Si *Uca* detecta un movimiento cerca del horizonte, lo más probable es que el objeto sea un coespecífico hembra o macho. A una distancia de 15 cm ya puede saber de que sexo se trata (los machos poseen una de sus quelas de enorme tamaño, lo que permite distinguirlos fácilmente de las hembras, que no la poseen) y tomar la decisión de proteger su cueva (si se acerca un macho) o realizar señales de apareamiento, si se acerca una hembra. La señal de apareamiento consiste en un movimiento oscilatorio de su quela mayor cuya frecuencia depende de la especie.

Estos ejemplos muestran la complejidad del proceso de detección visual y toma de decisión de *Uca* en su ambiente natural. En la detección de objetos vemos como el significado parece depender de su posición respecto a la línea del horizonte, o dicho de otro modo, la porción de la retina con la que se percibe la imagen. Un mismo objeto (por ejemplo un cuadrado de  $3^\circ$ ) genera respuestas



distintas dependiendo de su posición. En este contexto ya no interesa la codificación de variables ópticas con mucha precisión (como por ejemplo en el aterrizaje de la abeja), sino que es más importante algunas propiedades cualitativas (pero muy informativas) de los distintos canales de información que fluyen en el animal (como tamaño aproximado del objeto, posición respecto del horizonte y otras como el color o la polarización de la imagen del objeto (ver figura 1.1).

Según estos investigadores, la relación entre una entrada visual y su salida motora en el comportamiento de *Uca* es compleja pero estaría regulada por un conjunto discreto de módulos: como vimos, dependiendo del significado que el animal asigne a un objeto (por ejemplo vecino hembra, macho o predador) el animal despliega un conjunto de comportamientos distintos. Si clasifica el objeto como *predador* seguirá la secuencia freezing - escape - entrada a la cueva. Si lo clasifica como *hembra de la misma especie*, despliega señales de apareamiento y movimientos indicando donde está su cueva. Finalmente, si no tiene cueva el cangrejo se orientará para poner al objeto peligroso en un costado y emprenderá la carrera para alejarse del mismo.

Esta descripción del comportamiento, según un conjunto (grande pero finito) de estados comportamentales encadenados que forman un *patrón fijo de comportamiento*, sigue la línea comenzada por investigadores como Timbergen, Lorentz y Von Frisch.

No obstante, es necesario advertir que cada uno de estos módulos no constituye necesariamente un comportamiento de todo o nada. Muy por el contrario, si consideramos por ejemplo el escape, vemos que los animales corrigen momento a momento la dirección y la velocidad de su huida en función de la información que obtienen del predador. Se trata así, de comportamientos altamente controlados por sistemas de retroalimentación.

## **1.2- Sistema visual de artrópodos y en especial de *Chasmagnathus*.**

Para generar todos los comportamientos expuestos en la tabla 1.1 se debe tener un sistema visual de alta calidad. En lo que sigue haremos una descripción resumida sobre la estructura y funcionamiento del sistema visual de los artrópodos y en particular del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. También repasaremos los trabajos que estudian la codificación neuronal frente a estímulos de colisión.

### **1.2.1- Información contenida en la luz y procesamiento en los fotorreceptores.**

La luz procede fundamentalmente del sol y es dispersada por la atmósfera generando un patrón de color y polarización de fondo (Kelber 2006, Werhner et. al. 2006), además, es absorbida y reflejada por distintos objetos en el ambiente del animal.

El sistema visual se ocupa de caracterizar la luz que llega al animal para informar sobre las propiedades que aumentan la probabilidad de supervivencia y reproducción.

El cangrejo *Chasmagnathus* tiene ojos compuestos: cada ommatidio recoge información desde una dirección particular del espacio. La separación entre un ommatidio y sus vecinos definen la resolución espacial  $\Delta\theta$ . En cada ommatidio se ubican 8 fotorreceptores y dentro de ellos, los fotones son absorbidos por moléculas de rodopsina. Esta molécula, absorbe con mayor probabilidad los fotones de una longitud de onda (color) y una dirección de polarización determinada (Kelber 2006, Wehrner et. al. 2006). En distintos fotorreceptores, las moléculas fotosensibles se pueden orientar en distintas direcciones, permitiendo así codificar la polarización de la luz. También, diferentes fotorreceptores pueden contener distintos tipos de moléculas fotoactivas lo que permite la visión en colores.

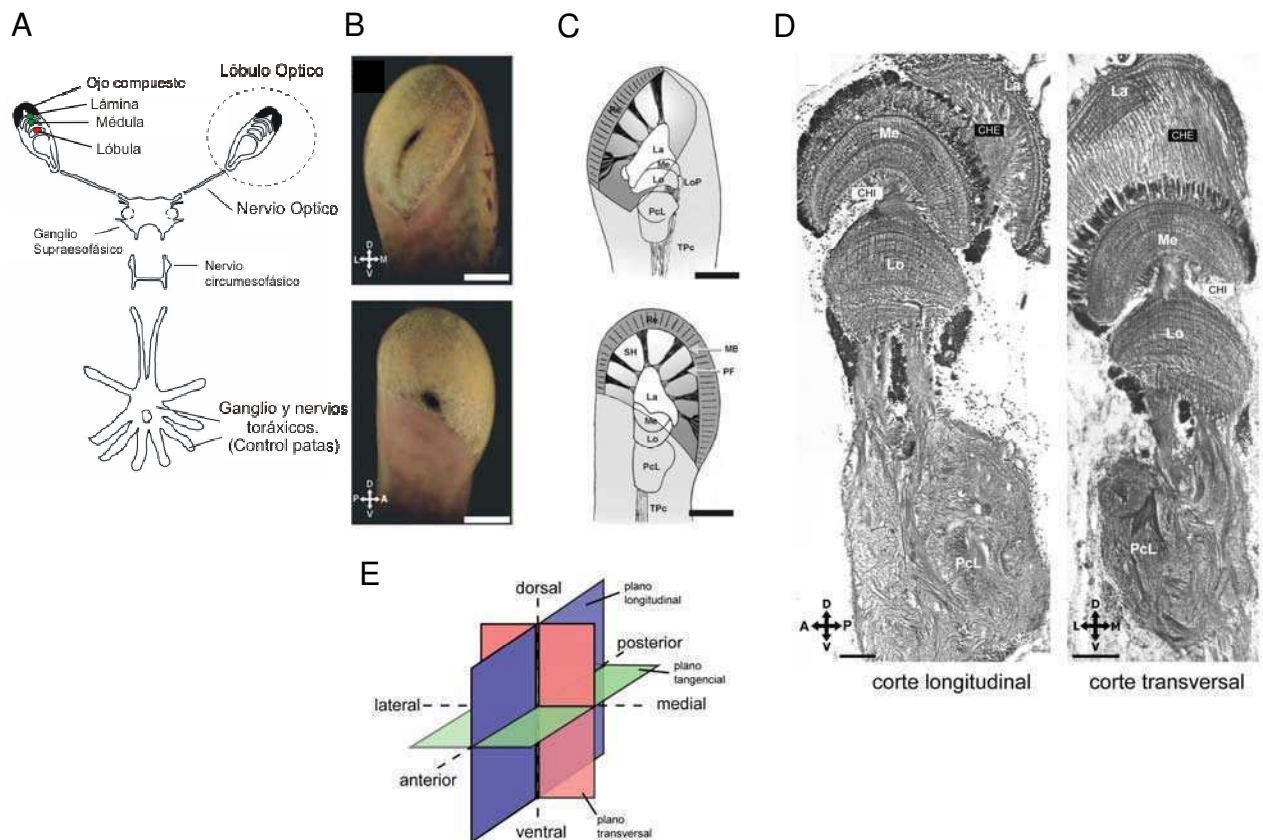
Luego de la absorción de los fotones, se disparan procesos de apertura o cierre de canales que generan corrientes macroscópicas (Hardie 2006) polarizando eléctricamente los fotorreceptores y esta información es transmitida y procesada luego por distintos circuitos neuronales.

### **1.2.2- Neuropilos visuales en artrópodos**

El sistema nervioso de los artrópodos incluye una serie de centros de procesamiento conectados por tractos. El esquema general de organización puede observarse en la figura 1.7.A, correspondiente al sistema nervioso de los cangrejos. Allí pueden reconocerse tres grandes centros,

los lóbulos ópticos, el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico. Los lóbulos ópticos son dos y se ubican cada uno dentro de un pedúnculo ocular. Cada lóbulo contiene una serie de neuropilos ópticos. La información adquirida en los fotorreceptores es procesada a través de distintas redes de neuronas en cuya actividad se codifican las propiedades de la escena que son relevantes para el animal. Una parte importantes de estos cómputos se realiza en los neuropilos ópticos que se hallan conservados evolutivamente en los insectos y crustáceos.

Desde la periferia (retina) hacia el centro estos neuropilos son llamados: Lámina, Médula, Lóbula, y Lóbula Plate. En la figura 1.7.B-E, se muestran cortes histológicos del sistema visual de *Chasmagnathus*. Desde los fotorreceptores hasta la Lóbula se ve un procesamiento extremadamente ordenado con procesos columnares y tangenciales que indican la existencia de representaciones retinotópicas. Por debajo de la Lóbula se encuentra el protocerebro lateral, este ultimo ganglio presenta una estructura menos ordenada.



**Figura 1.7: Los lóbulos ópticos de *Chasmagnathus*.** (A) Esquema general del sistema nervioso del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. (B) Fotografías y (C) esquema de las principales estructuras nerviosas de los lóbulos ópticos, en vista frontal (panel superior) y vista lateral (panel inferior). Escala: 500µm. (D) Tinción de Bodian mostrando la fibroarquitectura de los ganglios ópticos. Re: retina; MB: membrana basal; PF: fibras de los fotorreceptores; La: lámina; Me: médula; Lo: lóbula; PcL: protocerebro lateral; TPc: tracto protocerebral. Escala: 500µm. (E) Planos y ejes que se utilizarán como marco de referencia para las descripciones anatómicas. (Figura modificada a partir de Sztarker et al. 2005 y Medan 2008).

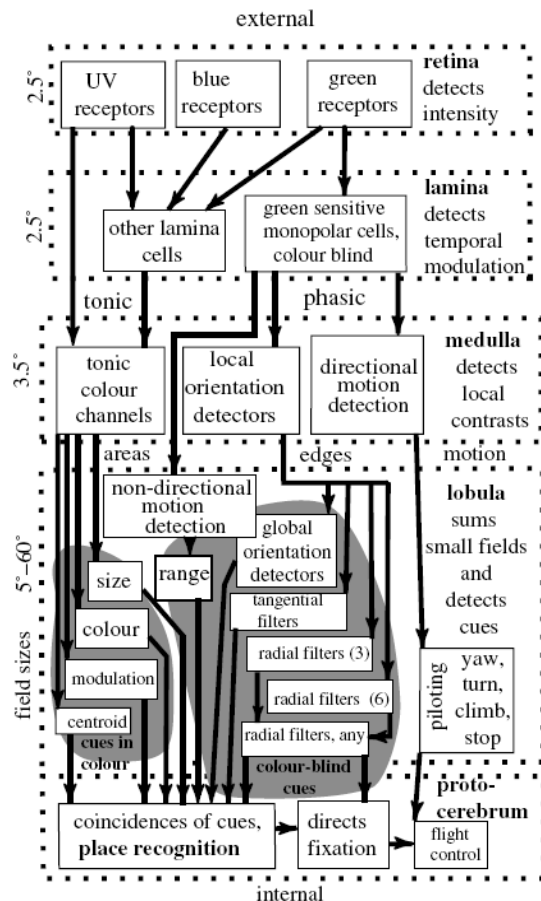
En la figura 1.8, mostramos un modelo funcional teórico del sistema visual de la abeja propuesto por Horridge. Su modelo está basado principalmente en experimentos comportamentales de reconocimiento de patrones visuales (Horridge 2000, 2005). Los experimentos comportamentales consisten en entrenar a las abejas en tareas donde deben elegir entre dos patrones visuales. En estos patrones se modifica tamaños, colores, orientaciones, centro de gravedad, formas, etc con el objetivo de predecir los detectores que este animal necesita tener para poder resolver las tareas de discriminación observadas. El modelo de Horridge tiene en consideración también resultados neurofisiológicos y neuroanatómicos obtenidos en insectos y crustáceos. De acuerdo a Horridge, los artrópodos poseen canales tónicos y fásicos en el lóbulo óptico que están asociados a dos características fundamentales de las imágenes: la detección de áreas y la detección de bordes respectivamente.

En la abeja, el arreglo de ommatidios permite una resolución de aproximadamente 2°. Si bien tienen visión en tres colores, los receptores más abundantes son los del color verde. Estos se adaptan lentamente a la luminosidad de fondo, pero se conectan con las células monopolares de la lámina (LMC) que se adaptan rápidamente a las luminosidades estáticas en todos los artrópodos estudiados. Estas neuronas con respuesta fásica están especializadas en sensar los cambios o modulaciones rápidas en la intensidad (Laughlin 1994). De este modo, las LMC responden intensamente cuando pasa un borde por su campo receptivo (que genera una variación rápida de luminosidad), pero no así cuando pasa un área uniforme que genera variaciones más lentas.

En la médula, numerosos elementos retinotópicos llamados células transientes en la langosta, tienen campos receptivos desde 2° a 20° y responden a bordes de distintos contrastes (Osorio 1987 a,b). El grupo de células transientes alimentan células de campo amplio que responden a bordes ubicados en regiones particulares del campo receptivo con una dirección particular (Yang y Maddess 1998).

Respecto al canal tónico, las neuronas sustaining de la médula codifican niveles estáticos de iluminación (Glantz 2003). Existen distintos tamaños de campo receptivo y sus inputs provienen de los tres tipos de receptores. Se han encontrado neuronas que responden a distintas combinaciones de colores (Hertel & Maronde, 1988). Estas neuronas serían los detectores de área y color que permiten explicar los resultados comportamentales de discriminación de forma y color (Horridge 1999b).

A nivel de la lóbula se observaron distintos detectores de orientación monocromáticos (Maddess 1997), detectores de objetos pequeños (O' Carroll) y detectores de colisión (Rind & Simmons 1992 y Hastopoulos 1995).



**Figura 1.8: Modelo computacional de Horridge en los neuropilos ópticos de la abeja.** Horridge se centra en los distintos tipos de detectores que la abeja debe tener para explicar su capacidad de reconocimiento de patrones manifestadas en numerosos experimentos comportamentales. En esta figura, la ubicación de los detectores fue inferida a partir de distintos trabajos de electrofisiólogos (Horridge 2000 y 2005).

Lo esencial de este modelo computacional es su relación potencial con los distintos comportamientos visuomotores de reconocimiento resumidos en la tabla 1.1. Lo discutimos para mostrar la complejidad del sistema visual de los artrópodos y de cómo los modelos propuestos dependen del comportamiento que está estudiando el investigador. Es importante tener esto en mente, ya que en esta tesis nos centraremos en la detección, codificación y respuesta comportamental a estímulos de colisión. Sin embargo, en la misma región del cerebro donde se procesa la información relativa a este tipo de estímulos, también se procesan otras informaciones (fig. 1.8).

### 1.2.3- Neuronas detectoras de colisión

Las imágenes de un objeto que se acerca en trayectoria de colisión, debe generar respuestas rápidas de protección. El animal necesita tener información de la dirección de aproximación del objeto y

de cuan inminente es una colisión para controlar sus sistemas de defensa y escape. La información procesada por estas neuronas se utilizará para generar las respuestas balísticas o controladas del animal.

Existen pocos modelos (crayfish, langosta, paloma y pez) donde se encontraron neuronas que proveen información relevante para estos comportamientos.

En principio podrían existir distintos tipos neuronales cada uno de los cuales podría codificar una variable óptica particular de la imagen, por ejemplo, el tamaño angular  $\theta(t)$  del objeto que se aproxima, o sus derivadas temporales como la velocidad angular  $\dot{\theta}(t)$  o aceleración angular  $\ddot{\theta}(t)$ .

Como vimos, utilizando estas variables, puede calcularse el tiempo restante a la colisión  $t_c$ , que se obtiene del siguiente modo  $t_c = \text{sen}(\theta)/\dot{\theta}$  y podemos aproximar por  $t_c \approx \theta/\dot{\theta}$  para ángulos  $\theta(t)$  pequeños.

Un objetivo central de los trabajos donde se estudian las neuronas detectoras de colisión es buscar la variable óptica que predice la tasa de disparo de la neurona. Para ello, se utilizará generalmente un modelo  $R(t) = F(z(t - \delta))$  donde  $R(t)$  es la tasa de disparo de la neurona,  $z$  es la variable angular que codifica,  $t$  es el tiempo,  $\delta$  es un defasaje y  $F$  es una no linealidad estática. En la tabla 1.3, resumimos variables ópticas que se hallan codificadas en la actividad de neuronas en distintos animales.

En el caso de la paloma se realizaron registros extracelulares en núcleos visuales (núcleo rotundus y tectum opticum) y se encontraron 3 tipos de neuronas (llamadas  $\eta$ ,  $\rho$ ,  $\tau$ ) que codifican información sobre colisiones (Sun et al. 1992, Wang & Frost 1998).

Las neuronas más destacadas son las  $\tau$  que aumentan fuertemente su tasa de disparo cuando falta aproximadamente 1 segundo para la colisión del objeto. Luego están las neuronas  $\rho$  que codifican velocidad angular  $\rho = \dot{\theta}$  y finalmente las neuronas  $\eta$  que codifican un producto de la velocidad angular y una función del tamaño angular  $\eta = \dot{\theta} \cdot e^{-\alpha\theta}$ .

En el caso del crayfish, se registraron neuronas extracelularmente a nivel del tracto protocerebral (Glantz 1974). Los trabajos de Wiersma (revisados en Wiersma 1982) permitieron caracterizar distintos tipos de *fibras sensibles al movimiento* (FSM) que responden al movimiento de un borde y presentan poca o ninguna respuesta frente a cambios estacionarios de luminosidad producidos por un pulso de luz. Las FSM se clasificaron en seis grupos en función de su respuesta frente a distintos estímulos visuales.

Una serie de trabajos realizados por Glantz (por ejemplo, Glantz 1974, 1977), revelan que las FSM estarían involucradas en el reflejo defensivo de crayfish de despliegue de quelas frente a la

aproximación de un objeto amenazante. Glantz propone que las FSM, en particular las *jittery movement fibers*, codifican la velocidad angular de expansión del objeto y disparan este reflejo defensivo (Glantz 1974).

Referencia	Animal	Neurona	Variable codificación
Sun et. al (1992)	Paloma	Neuronas $\eta$ , $\rho$ , $\tau$	$\tau = \theta / \dot{\theta}$ $\eta = \dot{\theta} \cdot e^{-\alpha\theta}$ $\rho = \ddot{\theta}$
Gabbiani et. al (1999)	Langosta <i>Locusta migratoria</i> o <i>Schistocerca americana</i>	LGMD	$\eta = \dot{\theta} \cdot e^{-\alpha\theta}$
Rind et. al (1992)	Langosta	LGMD	Aceleración angular $\ddot{\theta}$
Glantz (1974)	Crayfish <i>Procambarus clarkii</i>	Jittery movement fibers	Velocidad angular $\dot{\theta}$
Preuss et. al (2006)	Pez <i>goldfish</i>	Mauthner cell	$\kappa = \theta \cdot e^{-\alpha\theta}$

**Tabla 1.3:** Codificación de estímulos loomings por neuronas en distintos animales.

Pero sin lugar a dudas, la neurona de colisión mas estudiada es la LGMD (Lobula Giant Motion Detector) de la langosta. Para nuestro trabajo, esta neurona es muy importante por varios motivos:

- Es una neurona ampliamente caracterizada tanto morfológica como funcionalmente.
- Su relación con el comportamiento se encuentra bastante bien establecida (lo que no ocurre en la paloma).
- Se han desarrollado diversos modelos computacionales para explicar su funcionamiento de esta neurona (algunos claramente en controversia).
- La ubicación anatómica y organización morfológica de la LGMD de la langosta, coincide ampliamente con la ubicación y morfología que presentan las neuronas que investigamos en el cangrejo en la presente tesis.

Por ello, pasaremos a discutir en detalle lo que se conoce de la LGMD.

### 1.2.3.1 - Las neuronas LGMD y DCMD de la langosta

Desde hace 30 años varios grupos trabajan con la neurona LGMD (Lobula Giant Movement Detector) que se encuentra en el tercer neuropilo óptico (lóbula) de la langosta y se cree que cumple un rol importante en la respuesta de evitación de colisiones (Schlotterer 1977, Rind 1989, Hatsopoulos et.al 1995, Gabbiani et.al 1999) (ver figura 1.9.A).

Esta neurona se encuentra en la lóbula de la langosta y junto a las fibras detectoras de movimiento del crayfish, es uno de los ejemplos más cercanos evolutivamente a *Chasmagnathus* y mejor estudiados.

La LGMD posee conexiones con la neurona DCMD (Descending Contralateral Movement Detector) que inerva varias interneuronas y motoneuronas del ganglio torácico. Las sinapsis (químicas y eléctricas) entre la LGMD y DCMD hace que un spike de la LGMD produzca un spike en la DCMD (ver figura 1.9.B).

La facilidad de realizar registros intra y extracelulares in vivo, sumado al conocimiento adquirido sobre neuronas en el ganglio motor (Burrows 1996) hacen de este animal, un modelo óptimo para el estudio de la codificación neuronal en el lóbulo óptico y su relación con la respuesta de escape (Fotowatt y Gabbiani 2007).

Actualmente se está investigando la biofísica y capacidades de computo de esta neurona (Perón et.al 2009, Gabbiani et.al 2002) y su relación con las respuestas comportamentales de steering y salto (Santer et.al 2005, 2006, Fotowat et.al 2007).

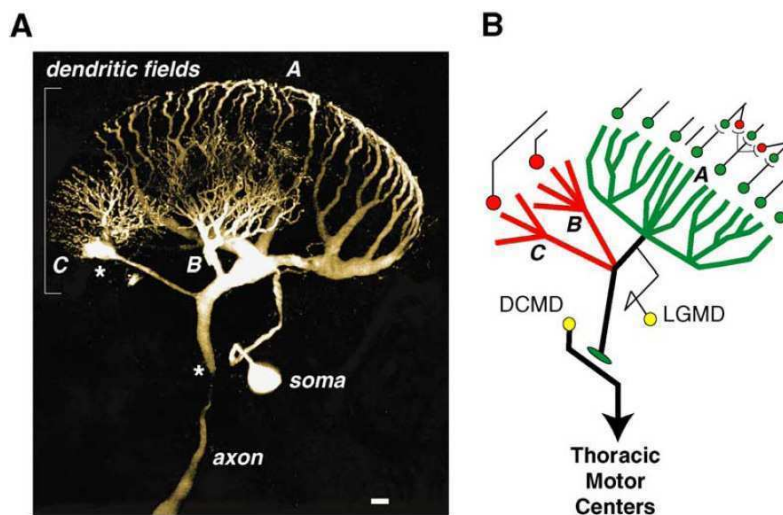
La LGMD posee tres árboles dendríticos diferenciados A, B y C (ver figura 1.9). El campo A recibiría señales excitatorias de movimiento a través de las neuronas columnares provenientes de la médula. Los subcampos B y C no serían retinotópicos y producirían respuestas fásicas (ON y OFF respectivamente) relacionadas con el tamaño del objeto (revisión en Gabbiani et.al 2004).

Las respuestas de la LGMD/DCMD a los estímulos loomings fueron estudiadas aplicando distintos estímulos visuales, llegando a las siguientes conclusiones:

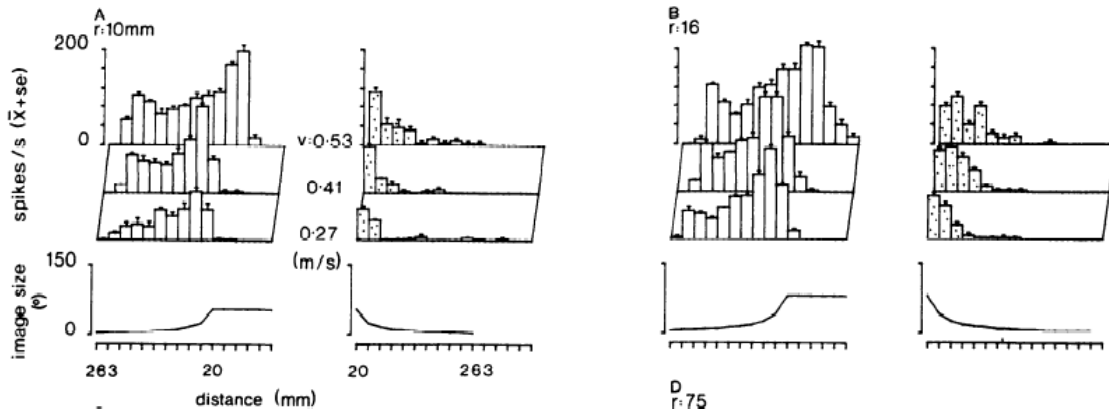
- a) La LGMD responde con mayor intensidad a objetos que a patrones de barras en movimiento. Esta evidencia asocia la codificación de esta neurona a comportamientos de detección de objetos más que al análisis de flujos ópticos de campo amplio (O'Shea et.al 1975). Se cree que esta propiedad resulta de fenómenos de inhibición lateral que ocurren río arriba de la LGMD.
- b) Para cuadrados con movimiento lateral a velocidad constante, la respuesta de la LGMD es inversamente proporcional al tamaño del cuadrado (Hatsopoulos 1995).



- c) La LGMD responde a estímulos de expansión con un incremento en la tasa de disparo. La respuesta para objetos que se acercan es mucho mayor que para objetos que se alejan (ver figura 1.10) (Rind et.al 1992).
- d) La respuesta de la LGMD/DCMD es intensa si se aplica un estímulo de colisión con una *expansión acelerada de los bordes* (Simmons et.al 1992). Para expansiones lineales ( $\theta(t) = \omega \cdot t$ ) la respuesta se adapta rápidamente (Simmons et.al 1992, Hastsopoulos 1995).
- e) La intensidad de la respuesta a estímulos de colisión depende de la ubicación del foco de expansión respecto al eje central del animal. La respuesta es máxima para aproximaciones laterales y disminuye a medida que el foco de expansión se produce en el frente del animal. Sin embargo, la suma de las respuestas de la LGMD del ojo derecho e izquierdo se mantiene constante para todas las direcciones de aproximación (Gabbiani et.al 2001).



**Figura 1.9:** A) Tinción intracelular de la LGMD. B) Esquema de los árboles dendríticos principales de la LGMD. Existen evidencias de que el árbol A integra retinotópicamente la información de los detectores elementales de movimiento (sinapsis verdes presinápticas al árbol A). Entre estas vías presinápticas existiría una inhibición lateral (sinapsis rojas). A través de los árboles B y C se produciría una inhibición de tipo feed-forward. Finalmente la LGMD hace sinapsis químicas y eléctricas con la neurona DCMD que desciende al ganglio torácico donde inerva distintas motoneuronas (Gabbiani et al. 2004).



**Figura 1.10:** A) Respuesta de la neurona DCMD a estímulos loomings de tamaño  $r=S/2=10\text{mm}$  (ver fig. 1.2) que se acercan o alejan con distintas velocidades ( $v=0.27, 0.41$  o  $0.53$  m/s). Los tres gráficos de la derecha corresponden a movimientos de aproximación y los de la izquierda a alejamientos. La dinámica de expansión (ángulo subtendido en función del tiempo se muestra abajo). B) En este caso el tamaño del objeto es mayor  $r=16\text{mm}$  y se mantuvieron las velocidades de aproximación o alejamiento. Como puede observarse en todos los casos, la neurona responde con mayor intensidad a objetos que se acercan (Rind & Simmons 1992).

f) Respecto a la codificación de las neuronas LGMD/DCMD existe una controversia en determinar cual es la variable óptica que predice la tasa de disparo en la neurona. Gabbiani y sus colaboradores proponen que la LGMD realiza un producto de las vías A que codifican la velocidad angular  $\dot{\theta}$ , con las vía B y C que inhiben la actividad en proporción al tamaño angular  $\theta$  (ver figura 1.9.b). Esta computación es descripta por un conjunto de ecuaciones (Hatsopoulos et.al 1995, Gabbiani et.al 1999). De acuerdo a este modelo, la tasa de disparo está dada por:

$$R_{LGMD}(t_c) = F(z(t_c - \delta)) \quad (\text{ec. 1.1})$$

$$z(t_c) = \dot{\theta}(t_c) \cdot e^{-\alpha\theta(t_c)}$$

Donde  $t_c$  es el tiempo a la colisión,  $\delta$  es un tiempo de defasaje y  $\alpha$  una constante dependiente de la neurona. La función  $F$  es una no linealidad estática.

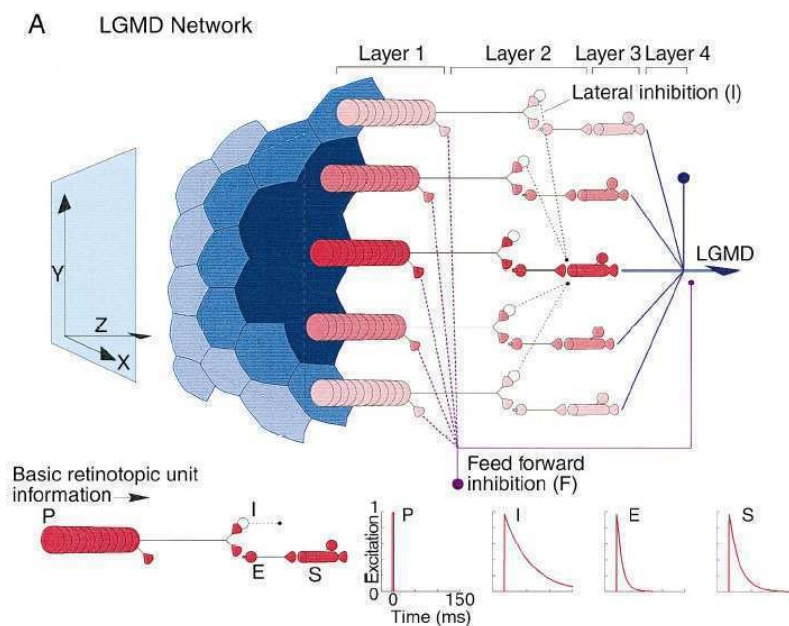
Por otro lado, Rind y colaboradores proponen que la tasa de disparo está principalmente determinada por la aceleración en el movimiento de los bordes en expansión. Este grupo propone un modelo computacional más complejo que se muestra en la figura 1.11 (Rind & Bramwell 1996).

Según este modelo, la actividad de la LGMD se puede entender por el procesamiento de cuatro capas sucesivas. La capa 1 está compuesta por los elementos P (ubicados con una separación de  $3^\circ$ ) que codifican cambios de luminosidad locales (estos elementos resumen el funcionamiento de los

fotorreceptores y las neuronas LMC de la lámina). En la capa 2, la excitación de las neuronas P es recibida por tres tipos celulares denominados E, I y F. Las neuronas E pasan una excitación rápida a las neuronas S (de la capa 3) ubicadas en su misma posición retinotópica, mientras que las neuronas I inhiben a las seis neuronas S vecinas (esta inhibición se denomina *lateral inhibition LI*). Por otro lado, las neuronas F integran la actividad de muchas unidades P y llevan una inhibición directamente a la LGMD a través de los árboles B y C (esta inhibición se denomina *feed-forward inhibition FFI*).

En la capa 3, las neuronas S son excitadas por la neuronas E e inhibidas por las I. Finalmente la LGMD acumula toda la actividad de las neuronas S y esta operación se realizaría en el árbol dendrítico A.

Según este modelo, los elementos P codifican los bordes en movimiento en cada columna (asociada a una dirección angular). Esta información produce una excitación rápida de S (a través de E) y una inhibición más lenta (a través de los elementos I vecinos). Esta información es colectada por la LGMD. De este modo, según Rind, la actividad de la LGMD está determinada por una carrera crítica entre las excitaciones y las inhibiciones.



**Figura 1.11:** A) Modelo computacional de la neurona LGMD propuesto por Rind et.al 1996. En este modelo la actividad de la neurona proviene de un procesamiento en capas sucesivas. Los elementos P codifican los variaciones de luminosidad en cada columna (asociada a una dirección angular). Esta información produce una excitación rápida de S (a través de E) y una inhibición más lenta de S (a través de los elementos I vecinos). Esta información es colectada por la LGMD en su árbol dendrítico A. De este modo, según Rind, la actividad de la LGMD está dada por una carrera crítica entre las excitación y las inhibiciones.

Desde nuestro punto de vista, las diferencias fundamentales provienen del método adoptado en la elección de los estímulos y en el modelado de los resultados obtenidos. Ambos grupos están de acuerdo en la importancia de estas neuronas en la codificación de estímulos de colisión y del rol que cumplen la LI y FFI en moldear su respuesta (Gabbiani et.al 2002 y Rind et.al 1996).

No se debe perder de vista que todas las descripciones son parciales, por ejemplo, el modelo de la ecuación 1.1 se ajusta bien a resultados obtenidos con objetos que se expanden desde tamaño inicial menores a 5° (Gabbiani et al. 1999) pero falla en la predicción de la respuesta a estímulos más complejos utilizados en (Rind et al. 1992, Simmons et.al 1992 y Gabbiani et al. 2002).

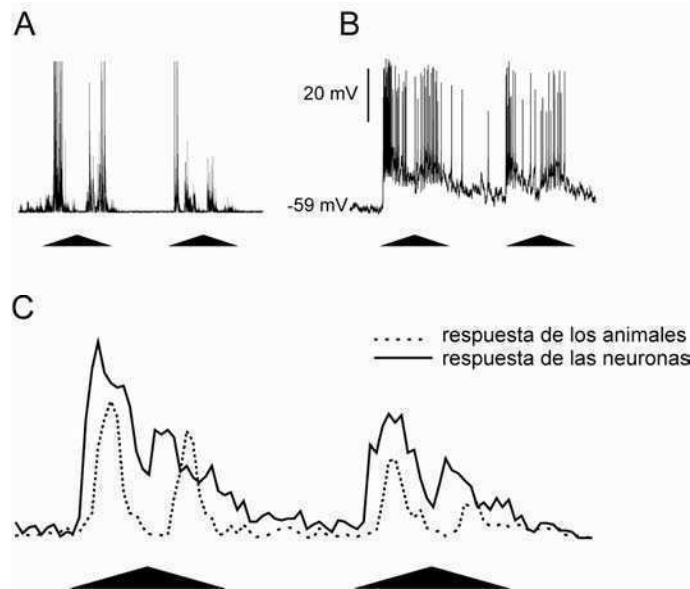
### **1.3 - La lóbula de *Chasmagnathus* y sus neuronas gigantes**

A partir de 1998, nuestro grupo se dedicó a estudiar las neuronas de los neuropilos ópticos de *Chasmagnathus* con énfasis en el tercer neuropilo (denominado lóbula), encontrando elementos altamente sensibles al movimiento. En la primera etapa, se caracterizaron elementos neuronales mediante registros intracelulares seguidos de tinciones de las unidades registradas (Berón de Astrada *et al.*, 2001; Berón de Astrada & Tomsic, 2002). Posteriormente se comenzó a estudiar la organización neuroanatómica de los neuropilos ópticos (Sztarker *et al.*, 2005; Sztarker et al. 2009) (ver figura 1.7).

Como el resto de los neuropilos ópticos, la lóbula está formada por procesos tangenciales de gran tamaño en las direcciones antero-posterior (procesos APT) y latero-medial (procesos LMT). Existen 5 capas APT y 4 capas LMT (Sztarker et.al 2005) (ver figura 1.2.1). En cada uno de estratos se ubican las neuronas tangenciales que recolectan información del mosaico retinotópico y responden intensamente a objetos en movimiento (Berón et. al 2001, Sztarker et.al 2005, Medan et.al 2007, Oliva et.al 2007).

Estas neuronas muestran las siguientes características: 1) mayor sensibilidad por el movimiento que por cambios estacionarios en la iluminación; 2) una tendencia a disminuir su respuesta frente a la estimulación reiterada; 3) en algunos casos, sensibilidad a estímulos mecánicos aplicados en distintas parte del cuerpo del animal; 4) cierta direccionalidad. Inicialmente llamaron al conjunto de estos elementos Neuronas Detectoras de Movimiento y actualmente son denominadas Neuronas Gigantes de la Lóbula (neuronas LG).

Un descubrimiento muy interesante fue que la respuesta las LG a un estímulo de peligro consistente en una pantalla negra sobre el animal, correlaciona con la respuesta comportamental de escape del cangrejo (fig. 1.12) (Tomsic *et al.*, 2003).

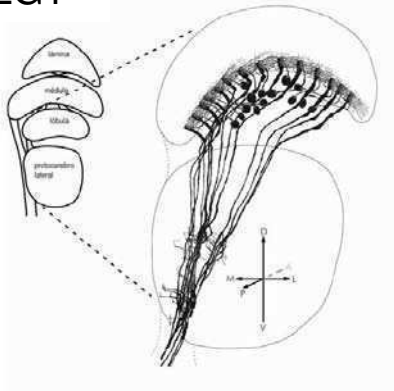


**Figura 1.11 - Respuestas comportamentales y neuronales al EA.** A. Registro (en unidades arbitrarias) de la respuesta de escape de un animal al un estímulo de peligro (el pasaje del estímulo se simboliza con un triángulo negro). B. Registro de la respuesta de una NDM (luego LG) a la misma estimulación. C. Histograma periestímulo de las respuestas neuronales y comportamentales derivadas de datos poblacionales (respuestas comportamentales N=40; respuestas neuronales N=40, de 40 animales distintos). Se cuantificaron el número de picos de voltaje (comportamiento) o de PA (neuronas) en segmentos de 100ms. (Tomsic et al. 2003).

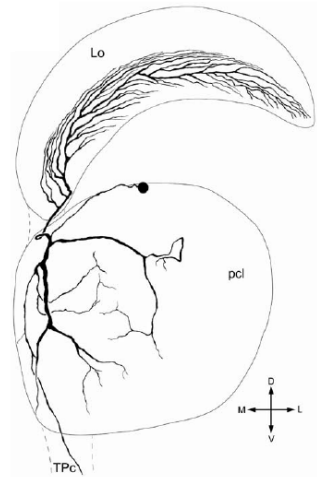
Además, se encontró que estas neuronas reflejan los cambios comportamentales a corto y largo término que se producen luego de la estimulación repetitiva y, actualmente, se piensa que tienen un rol fundamental en la formación y mantenimiento de las memorias visuales en el cangrejo (Tomsic *et al.*, 2003). Más aún, los cambios neuronales inducidos por el aprendizaje persisten incluso cuando la posición del estímulo dentro del campo visual del animal es desplazada, fenómeno conocido como invarianza de traslación. Estos datos indican que las LG colaboran en la capacidad de generalización entre memorias adquiridas en distintas partes del campo receptivo visual (Sztarker et al. 2006).

Partiendo de la información de estos trabajos, se caracterizaron detalladamente las propiedades anatómicas y electrofisiológicas de 4 tipos de neuronas denominadas: Neuronas Gigantes de la Lóbula Monoestratificadas 1 y 2 y Neuronas Gigantes de la Lóbula Biestratificadas 1 y 2. Estas neuronas se denominan (de su nombre en ingles) MLG1, MLG2, BLG1 y BLG2 respectivamente. En la figura 1.12 se muestra su anatomía según Medan et.al (2007).

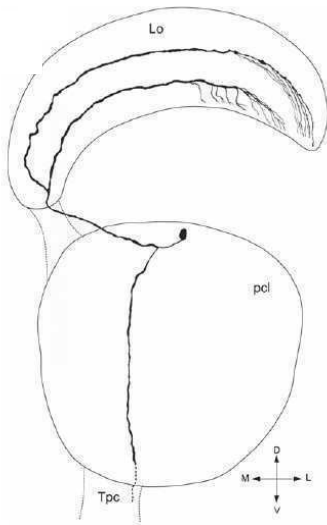
MLG1



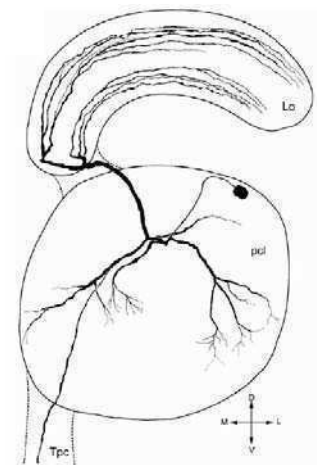
MLG2



BLG1



BLG2



**Figura 1.12: Reconstrucciones de las neuronas gigantes de la Lóbula de *Chasmagnathus granulatus* a partir de tinciones intracelulares.** (A) Neuronas MLG1. Forman un conjunto de 14 neuronas con campos receptivos restringidos a distintas posiciones del campo visual. (B) Neuronas MLG2. Estas neuronas se encuentran en el mismo estrato que MLG1. Poseen actividad espontánea regular, son mecanosensoriales y de campo amplio. (C) Neuronas BLG1: Son neuronas biestratificadas con campo receptivo amplio, mecanosensoriales y actividad basal regular. BLG2: Son neuronas biestratificadas con campo receptivo amplio, mecanosensoriales y actividad basal con burst (Medan et al. 2007).

A partir de este trabajo en el que colaboré y que se fue desarrollando en paralelo a mi trabajo de doctorado, mostramos que las neuronas gigantes de la lóbula son detectoras de objetos y que su actividad a un patrón optomotor es reducida. Esto indica que estas neuronas estarían involucradas en comportamientos de interacción con objetos más que con la detección del flujo óptico de campo amplio (ver figura 1.1). Otra consecuencia práctica importante de este trabajo es que, a partir de la actividad electrofisiológica, podemos predecir con un alto grado de fiabilidad el tipo de neurona que estamos registrando sin necesidad de teñirlas intracelularmente.

Para clasificar las neuronas adquiridas en distintos grupos, se utilizaron propiedades como el tamaño del campo receptivo, su frecuencia espontánea de disparos, su actividad mecanosensorial y su respuesta a un flash de luz, (Medan et. al 2007). Algunas de las propiedades de la respuesta neuronal que fueron utilizadas para su clasificación se resumen en la tabla 1.4.

Neurona	Capas Lóbula	Arborización	Tamaño Campo Receptivo	Mecano-Sensorial	Actividad Espontánea
<i>MLG1</i>	APT 4 LMT3	20% largo Lóbula	Restringido $51^{\circ} \pm 15^{\circ}$	No	Silente
<i>MLG2</i>	LMT3	Toda Lóbula	Grande	Si	Regular
<i>BLG1</i>	LMT2 LMT3	Lóbula Lateral	Grande	Si	Regular
<i>BLG2</i>	LMT2 LMT3	Toda Lóbula	Grande	Si	Burst

**Tabla 1.4:** Algunas propiedades de las 4 neuronas gigantes de la lóbula caracterizadas según Medan et.al 2007. Utilizando parámetros tales como el tamaño del campo receptivo, la actividad espontánea, la actividad mecanosensorial y la respuesta a un pulso de luz, podemos predecir que neurona estamos registrando, sin necesidad de teñirlas.

## Resumen de antecedentes descriptos que motivaron esta tesis

De los antecedentes presentados en el capítulo 1 se desprenden los motivos que dieron lugar a este trabajo:

- Los artrópodos constituyen modelos animales interesantes y útiles para el estudio de las bases neurofisiológicas de comportamientos visuomotores. Esto se debe fundamentalmente a la variedad de comportamientos que exhiben conjuntamente a la relativa simplicidad de sus sistemas nerviosos.
- Uno de los comportamientos visuomotores de importancia fundamental para la supervivencia de los animales es el de evitación de colisiones. Este comportamiento debe ser rápido y preciso, a tiempo que puede ser muy complejo e incluir procesos de toma de decisiones sucesivas.
- Las respuestas de evitación a objetos que se acercan pueden ser del tipo balístico (todo-nada) o graduadas instantáneamente en función de la entrada visual.
- Existe mucho interés en la comunidad científica por entender como las neuronas detectoras de movimiento procesan las señales de movimiento asociadas a objetos en trayectoria de colisión.
- A nivel de codificación neuronal, *Chasmagnathus* es un modelo animal óptimo ya que su duro exoesqueleto permite realizar registros intracelulares en el animal intacto.
- Existen evidencias sobre una alta correlación entre la actividad de las neuronas gigantes de la lóbula y los comportamientos de escape de *Chasmagnathus* a corto y largo término. No obstante, son pocos los modelos experimentales donde se ha logrado identificar neuronas detectoras de colisión, y mucho menos aquellos donde la actividad de estas neuronas a podido relacionarse con una respuesta comportamental. Más aun, los modelos experimentales donde esto a sido posible se trata de respuestas de tipo balística. En efecto, no existe un modelo de estudio en donde se hallan podido identificar neuronas de colisión involucradas en el control de una respuesta de evitación regulada.
- Se caracterizó la anatomía y propiedades fisiológicas de cuatro tipos neuronales de *Chasmagnathus* asociados a la detección de movimiento, denominados MLG1, MLG2 y BLG1 y BLG2. La actividad de estas neuronas parece estar asociada a la interacción con objetos y no a la medición del flujo óptico de campo amplio.



### **Objetivos específicos:**

- Desarrollar un dispositivo que permita estimular visualmente y medir en forma precisa la respuesta locomotora de escape de *Chasmagnathus* a estímulos que simulan objetos que se acercan en trayectoria de colisión (Capítulo 2).
- Caracterizar la respuesta del animal a estos estímulos para entender cuales son los parámetros visuales las imágenes de los objetos que se acercan más importantes y que generan una respuesta consistente en el animal (Capítulo 3).
- Estudiar como el animal toma la decisión de comenzar un escape y como regula su velocidad (Capítulos 4).
- Caracterizar la respuesta de las LG a distintos estímulos para determinar que propiedades de los mismos codifican y que variables ópticas regulan su actividad (Capítulo 5).
- Identificar la relación entre la actividad de las neuronas gigantes de la lóbula con la respuesta motora, para determinar su participación en la respuesta de escape. Realizar un modelo simple que integre los resultados comportamentales y neuronales (Capítulo 6).

## Capítulo 2

### **Materiales y Métodos Generales. Desarrollo de un dispositivo experimental para la medición de comportamientos visuomotores en *Chasmagnathus granulatus*.**

#### **2.1- Animales**

Se utilizaron cangrejos *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) machos. La especie pertenece a la superclase Crustacea, clase Malacostraca, orden Decapoda, familia Grapsidae. Los animales utilizados tenían entre 2,7 y 3,1cm de ancho de caparazón y peso medio de  $17 \pm 0,2$ g.

*Chasmagnathus* es un cangrejo terrestre eurihalino que habita las zonas costeras de Argentina, Uruguay y Brasil. Ocupa los bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición entre agua dulce y marina.

Los animales fueron colectados en las rías de San Clemente del Tuyú, Buenos Aires, Argentina, transportados al laboratorio y alojados de a 20 en cubas plásticas de 35x48x27cm. Éstas fueron llenadas hasta 2cm con agua de salinidad=10-14 ‰ y pH=7,4-7,6 (Marinemix, Baltimore, USA). En el laboratorio, los animales permanecieron bajo un régimen de luz:oscuridad 12:12 (las luces se prendían 8AM) a una temperatura entre 22-24 °C. Los experimentos fueron realizados durante todo el año entre las 9 y las 19hs durante los primeros 15 días de llegada de los animales al laboratorio.

#### **2.2- Dispositivo para estimular y medir la respuesta visuomotora de *Chasmagnathus granulatus*.**

Nuestro objetivo a nivel comportamental es caracterizar la relación entre *la entrada visual y la salida motora* del animal ante estímulos de colisión.

En lo que se refiere a la *entrada visual* intentaremos evaluar los efectos de variar distintos parámetros del estímulo, por ejemplo:

- 1) la *dirección* de donde proviene el objeto en trayectoria de colisión.
- 2) la *dinámica temporal* de la expansión.

3) el *contraste* del objeto respecto a la luminosidad del fondo.

Respecto a la *salida motora*, queremos medir la trayectoria, distancia, velocidad, etc de la respuesta de escape del animal.

Para caracterizar la relación entrada-salida visuomotora, desarrollamos el dispositivo de la figura 2.1.

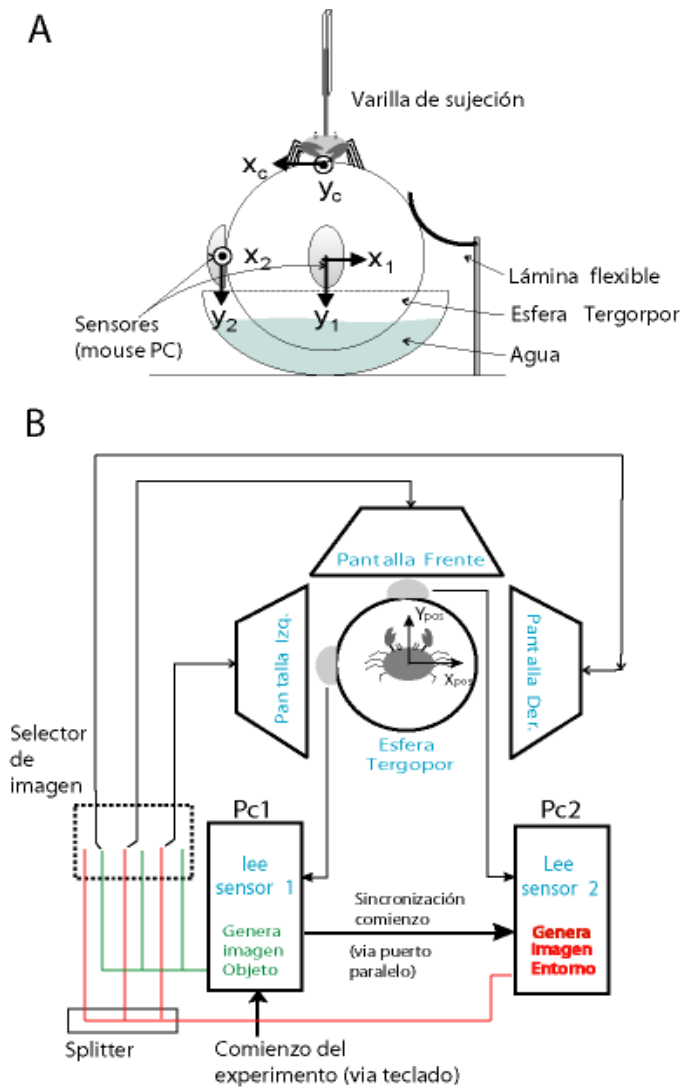
### **2.2.1- Medición de la actividad locomotora:**

Para medir la actividad locomotora del cangrejo, se apoya sobre una esfera de tergopor (16 cm de diámetro) que flota en agua (ver figura 2.1.A). El animal está fijado por medio de una varilla de madera liviana con sección cuadrada. Esta varilla puede deslizarse verticalmente dentro de una guía permitiéndole al animal adoptar su postura natural. Debido a la sección cuadrada de la varilla, el animal no puede girar en torno a su eje.

Cuando el cangrejo camina, corre o gira, lo hace haciendo rotar la esfera. El movimiento de la esfera es registrado con dos sensores ópticos leídos por dos computadoras denominadas PC1 y PC2 (cada sensor corresponde a un mouse óptico, ver figura 2.1.B). Con los desplazamientos medidos por los dos sensores ópticos, se puede reconstruir la trayectoria del animal.

Cuando el cangrejo quiere desplazarse, produce fuerzas horizontales que podrían desplazar la esfera impidiendo el contacto de la misma con el sensor óptico. Esto produciría la pérdida de lecturas. Para evitar este problema, se utilizaron dos láminas flexibles de acetato ubicadas en el lado contrario a cada sensor (ver figura 2.1.A). Debido a la presión de las láminas flexibles, la esfera se mantiene siempre en contacto con los sensores ópticos.

La superficie de los sensores ópticos es recubierta por una lámina de acetato transparente. Esto impide el contacto del sensor con la superficie mojada de la esfera y además reduce el rozamiento entre la esfera y el sensor.



**Figura 2.1. Dispositivo experimental para medir la actividad visuomotora de *Chasmagnathus*.** (A) La medición de la respuesta locomotora fue estudiada apoyando al cangrejo sobre una esfera de tergorpor (flotando en agua) que podía rotar fácilmente cuando el cangrejo intenta desplazarse. El animal está fijado por medio de una varilla liviana con sección cuadrada. Esta varilla puede subir o bajar según su postura adoptada por el animal. Debido a la sección cuadrada de la varilla, el animal no puede girar en torno a su eje. Dos láminas flexibles mantienen a la esfera en contacto con la superficie de los sensores ópticos. En esta figura también se muestra la convención utilizada para los ejes de los sensores ópticos con los cuales se registran los movimientos de la esfera (ver texto). (B) El animal está rodeado por cinco monitores (los monitores que se encuentran en la parte superior y posterior no se muestran). El desplazamiento realizado por el animal se mide sobre los movimientos de la esfera con dos sensores ópticos. Cada sensor envía sus señales a la computadoras denominadas PC1 y PC2. La PC1 además de leer el sensor 1, genera la imagen de la expansión (denominada imagen *Objeto*). La PC2 genera una imagen de *Entorno*. Luego de generar 5 copias de cada imagen con un splitter, un selector permite asignar a cada monitor la imagen que se mostrará en cada monitor.

Se evaluó la existencia de una relación lineal entre el desplazamiento de la superficie de la esfera y la tasa de incremento de lecturas en los sensores ópticos. Esto se cumple mientras la velocidad de desplazamiento de la superficie de la esfera es menor a 60cm/s.

Utilizando las lecturas de los sensores calculamos el desplazamiento del animal  $\Delta x_c(t)$  y  $\Delta y_c(t)$  y rotación  $\Delta \phi_c(t)$  alrededor de su eje vertical cada 16.7 ms. En la figura 2.1.A describimos las convenciones de los ejes utilizadas, de este modo:

$$\Delta x_c(t) = \alpha_2 \cdot \Delta y_2(t), \Delta y_c(t) = \alpha_1 \cdot \Delta y_1(t), \Delta \phi_c(t) = \beta_1 \cdot \Delta x_1(t) = \beta_2 \cdot \Delta x_2(t) \quad \text{ec. 2.1}$$

Las magnitudes  $\Delta x_1, \Delta y_1, \Delta x_2, \Delta y_2$  son los incrementos de lecturas en los eje (x,y) de los sensores 1 y 2 (figura 2.1.A). Los parámetros  $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$  son constantes de calibración con unidades en cm/pixels.

Las constantes de calibración se obtuvieron desplazando la esfera distancias conocidas en todas direcciones.

Acumulando los desplazamientos medidos podemos reconstruir la trayectoria (x,y) del animal y la rotación en torno a su eje, en función del tiempo:

$$x_c(t) = \sum_{t'} \Delta x_c(t'), \quad y_c(t) = \sum_{t'} \Delta y_c(t'), \quad \phi_c(t) = \sum_{t'} \Delta \phi_c(t') \quad \text{ec. 2.2}$$

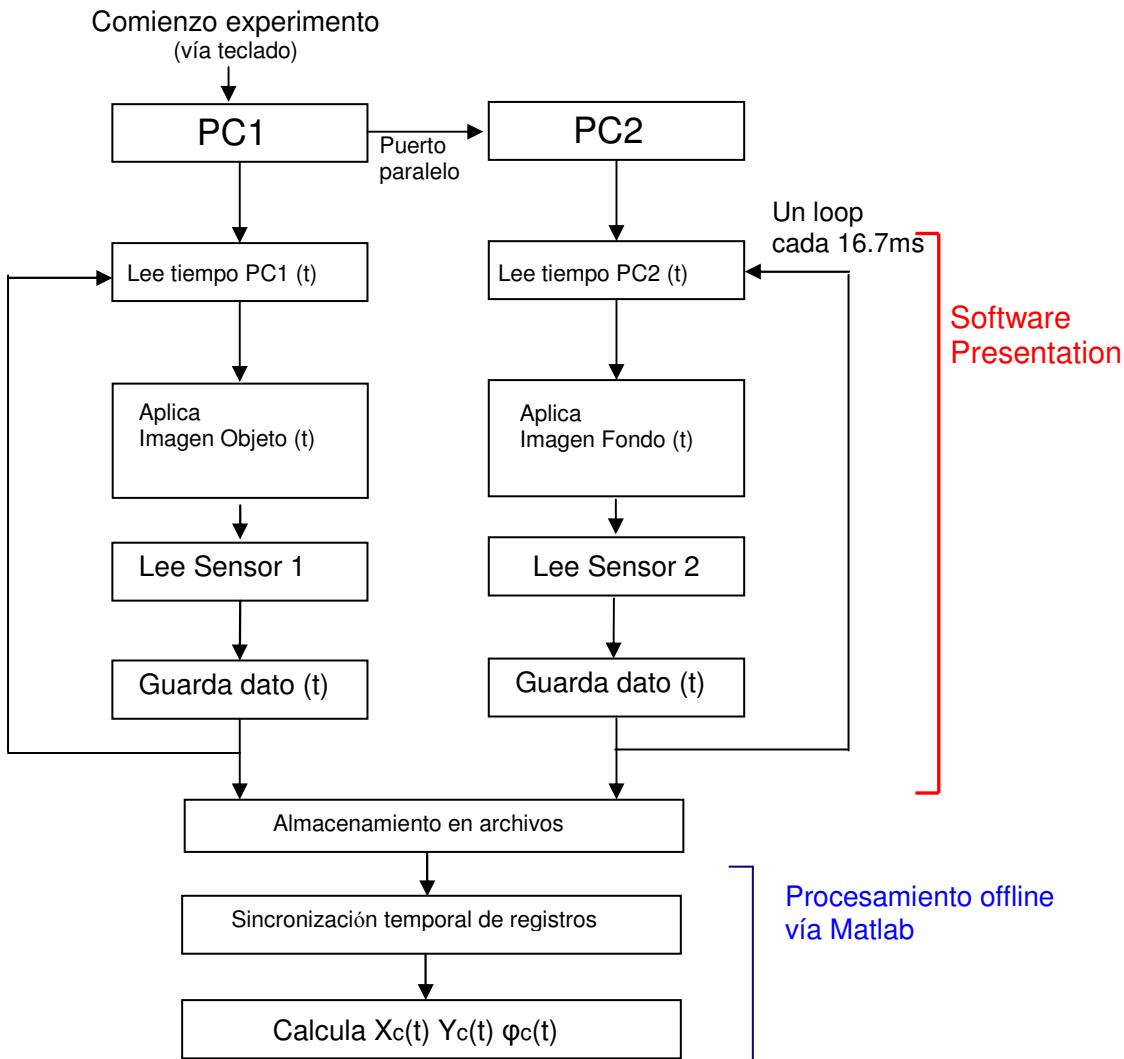
### 2.2.2- Estimulación visual y sincronización con la medición de la actividad locomotora:

En la sección anterior vimos como medir la trayectoria del animal. En esta sección agregaremos la estimulación visual a la medición de la actividad locomotora.

En la figura 2.2 esquematizamos el funcionamiento del dispositivo mostrado en la figura 2.1.B. Cuando se decide comenzar un experimento se envía una señal a la PC1 (por ejemplo, vía teclado). La PC1 envía un pulso (vía puerto paralelo) a la PC2 y las dos computadoras comienzan una serie de ciclos. Cada ciclo está compuesto por los siguientes procesos: A) lectura de sus relojes internos para la medición del tiempo. B) aplicación de las imágenes que ve el animal. C) lectura de los sensores ópticos y D) almacenamiento de estos datos en memoria.

Los estímulos visuales se programaron con el software (Presentation 5.3, Neurobehavioral Systems, Albany, USA). Este programa está instalado en la PC1 y PC2 y aplica cada 16.7ms (tasa de refresco) una imagen distinta (ver figura 2.2).

Luego de aplicar cada imagen, el programa permite leer el sensor óptico y el tiempo del reloj interno de la PC. Finalmente se guarda en memoria una matriz de datos con los valores: Tiempo, estímulo aplicado, y estado del sensor óptico (coordenadas x,y del mouse óptico) en cada ciclo.



**Figura 2.2. Esquema de funcionamiento del dispositivo para la estimulación visual y la medición de la actividad locomotora.**

La señal de comienzo del experimento proviene de la PC1 y es enviada instantáneamente a la PC2. Desde ese momento cada PC aplica ciclos que duran 16.7 ms. Cada ciclo está compuesto por una lectura de tiempo del clock de la PC, una aplicación de la imagen, una lectura del sensor óptico y finalmente se guarda los datos en una matriz. Al finalizar los ciclos correspondientes al experimento, cada PC guarda las matrices de datos adquiridos en un archivo. Los dos archivos generados, se sincronizan off-line con un programa desarrollado en Matlab.

Para proveer la estimulación visual, el animal está rodeado por 5 monitores (Philips 107T, 17", de tasa de refresco de 60Hz a una resolución de 800x600 píxeles). Pantallas antirreflex puestas por delante de los monitores previenen la aparición de reflejos que podría estimular de forma no controlada al animal.

En cada ciclo, la PC1 genera una nueva imagen *Imagen Objeto(t)* que verá el animal durante 16.7 ms. La PC2 genera la imagen *Imagen Entorno(t)* que se muestra en los otros monitores y que consiste usualmente en un fondo negro. Utilizando un splitter multiplicamos en 5 canales las imágenes *Objeto(t)* y *Entorno(t)*. Cada monitor tiene asociado un selector con el que podemos elegir si queremos que muestre la imagen *Objeto(t)* o la imagen *Entorno(t)* (ver figura 2.1.B). Estos selectores se ubican fuera del dispositivo, permitiendo realizar cambios en las direcciones de estimulación sin que perturbar al animal.

Una vez finalizado el experimento, las matrices de datos asociadas a cada PC son guardadas en archivos. Finalmente, un programa desarrollado en Matlab, toma los dos archivos y con las señales de tiempo sincroniza las lecturas de las PC1 y PC2.

## 2.3- Estímulos utilizados.

### 2.3.1- Estímulos que se acercan a velocidad constante.

Los estímulos de colisión más utilizados en la bibliografía y en esta tesis, simulan objetos que se aproximan al animal a velocidad constante. En la figura 2.3 mostramos como se generan.

Supongamos que el objeto es un cuadrado y se acerca desde la derecha. El cuadrado tiene tamaño  $S$  (elegimos la notación  $S$  por la palabra *Size* del ingles) y el apotema del cuadrado es  $R=S/2$ . La distancia entre el ojo del animal y el objeto es  $x(t)$  y el objeto subtiende un ángulo  $\theta$  sobre el ojo. De este modo, podemos escribir:

$$\tan(\theta/2) = \frac{R}{x(t)} \quad \text{ec. 2.1}$$

Suponemos que la aproximación del objeto comienza desde una distancia  $L=10m$  y que el acercamiento es a velocidad constante  $v$  respecto al cangrejo (notar que  $v \leq 0$  en nuestro sistema de referencia). La posición del objeto será:

$$x(t) = L - |v| \cdot t \quad \text{ec. 2.2}$$

Donde  $|v|$ , es el módulo de la velocidad de aproximación. Definimos  $t$  como el tiempo, que vale  $t=0$  cuando comienza la aproximación y vale  $t=L/v$  cuando se produce la colisión  $x(t=L/v)=0$ .

El cuadrado dibujado en la pantalla del monitor (ver figura 2.3) tendrá un apotema que llamamos  $s_p(t)$  y dependerá de la distancia desde el monitor al ojo del animal  $d_p$ , del siguiente modo:

$$\tan(\theta/2) = \frac{s_p}{d_p} \quad \text{ec.2.3}$$

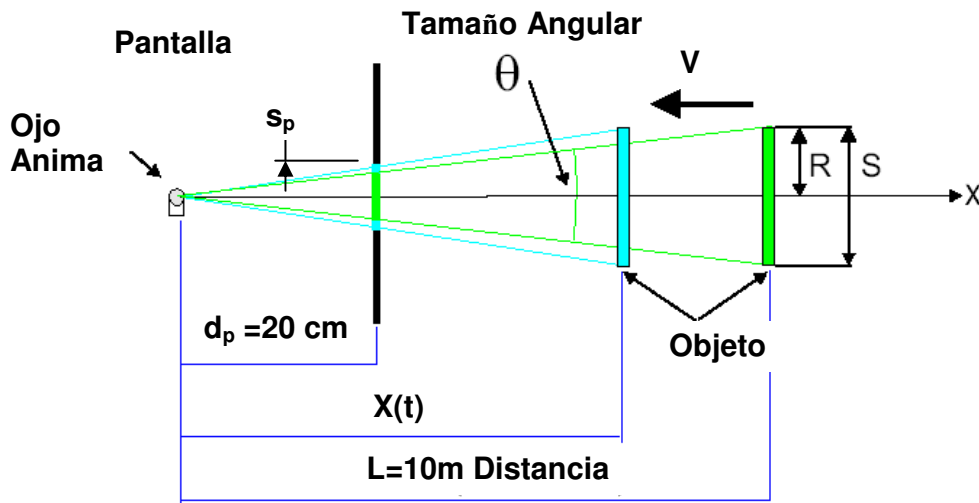
Igualando las ecuaciones 2.3 y 2.1 obtenemos:

$$\tan(\theta/2) = \frac{s_p}{d_p} = \frac{R}{x(t)},$$

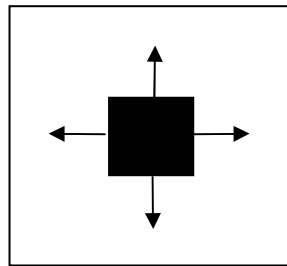
Utilizando la ecuación 2.2, despejamos el apotema del cuadrado que debemos dibujar en la

$$\text{pantalla: } s_p(t) = \frac{d_p \cdot R}{x(t)} = \frac{d_p \cdot R}{L - |v| \cdot t}. \quad \text{ec.2.4}$$

**A**



**B**



Vista desde el  
ojo del animal

**Figura 2.3. Simulación de un objeto que se acerca a velocidad constante.** (A) En la figura se muestra el objeto virtual a dos tiempos distintos. En verde se muestra la condición inicial y en celeste un tiempo intermedio luego de comenzar la aproximación.  $x(t)$  es la posición del objeto en un sistema de referencia centrado en el ojo del cangrejo.  $v$ : es la velocidad de aproximación respecto al cangrejo,  $\theta(t)$  es el ángulo total subtendido por el objeto en el ojo del cangrejo y  $s_p(t)$  es la apotema del cuadrado dibujado en la pantalla del monitor. (B) Vista desde el ojo del animal del objeto cuadrado en expansión.



De la ecuación 2.4 se puede ver que si mantenemos  $L$  constante, hay dos parámetros relevantes para describir la expansión:  $R$  y  $v$ . También podemos reescribir la ecuación 2.4 del siguiente modo:

$$\tan(\theta/2) = \frac{R}{L - |v| \cdot t} = \frac{R/L}{1 - (|v|/L) \cdot t} = \frac{\tan(\theta_0)}{1 - (|v|/L) \cdot t} \quad \text{ec.2.5}$$

Donde  $\theta_0 = \theta(t=0)$  es el tamaño angular inicial del estímulo. Por lo tanto, otra manera de describir una expansión looming particular es utilizando  $\theta_0$  y  $|v|$ .

Finalmente, es importante destacar que no se pueden simular todo el proceso de expansión porque nos vemos limitados por el tamaño del monitor y la distancia de este al ojo del animal. Por lo tanto las expansiones terminan cuando  $\theta(t) = 60^\circ$ .

**Estímulos utilizados:** Se simularon objetos de tamaño total  $S=2R$  que partían desde una distancia inicial  $L=10m$  y se acercaban a velocidad constante  $v$ .

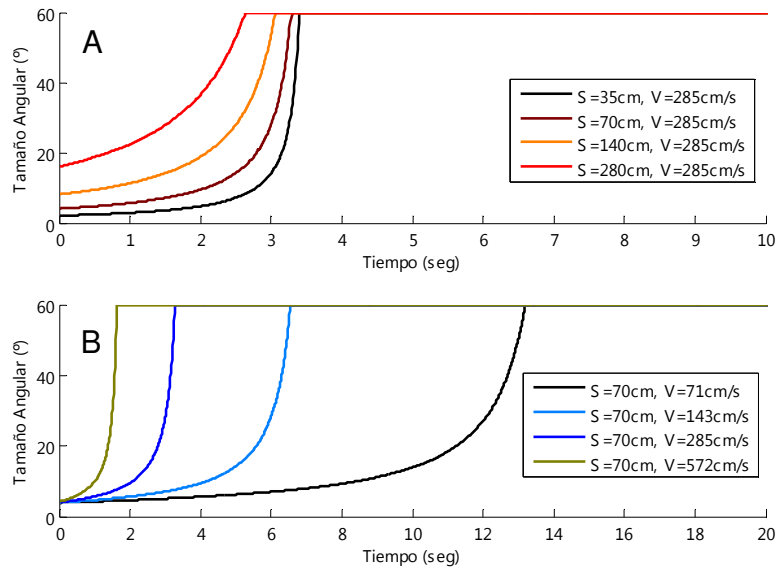
Se utilizaron un total de 8 estímulos (ver tabla 2.1):

- En los estímulos 1 a 4 se mantuvo  $v=285$  cm./s y se cambió el radio  $R$  del objeto.
- En los estímulos 5 a 8 se mantuvo  $R=35$  cm y se cambió la velocidad  $v$  del objeto.

Número Estímulo	R(cm)	S(cm)	V cm/s	$\gamma=R/V$ (ms)	L (m)	T (s)	$\theta_0$ (grados)	Tamaño Inicial (cm).
1	17	35	285	60	10	3.5	1.94	0.68
2	35	70	285	120	10	3.5	4	1.40
3	70	140	285	250	10	3.5	8	2.81
4	140	280	285	490	10	3.5	15.9	5.62
5	35	70	71	490	10	14	4	1.40
6	35	70	143	250	10	7	4	1.40
7	35	70	285	120	10	3.5	4	1.40
8	35	70	572	60	10	1.74	4	1.40

**Tabla 2.1. Estímulos loomings simulados con aproximación a velocidad constante** (ver figura 2.3). El parámetro  $S$  es el tamaño del objeto simulado que se aproxima,  $R=S/2$  (apotema),  $V$  es la velocidad de aproximación,  $L$  es la distancia desde donde parte el objeto,  $T$  es el tiempo de viaje entre la posición inicial hasta la colisión,  $\theta_0$  es el tamaño inicial del objeto en grados y el tamaño inicial en centímetros. El parámetro  $\gamma=R/v$  es utilizado para describir la dinámica en función del tiempo a la colisión (ver texto).

En la figura 2.4, mostramos el tamaño angular  $\theta(t)$  en función del tiempo para las ocho dinámicas de expansión correspondientes a la tabla 2.1.



**Figura 2.4:** A) Distintas dinámicas de expansión del tamaño angular  $\theta(t)$  visto por el ojo del cangrejo cuando se acerca un objeto de tamaño  $S=35\text{cm}$  hasta  $280\text{ cm}$  ( $L=10\text{m}$ ,  $V=285\text{cm/s}$ ). B) Evolución del tamaño angular cuando se varia la velocidad de aproximación desde  $v=71\text{ cm/s}$  hasta  $572\text{ cm/s}$ , ( $L=10\text{m}$ ,  $S=70\text{cm}$ ).

### Tiempo a la colisión:

En la bibliografía referida al estudio de colisiones (ejemplo Gabbiani et.al 1999), se utilizan diferentes convenciones para medir el tiempo. Una definición de tiempo muy utilizada es el *tiempo a la colisión*  $t_c = t - L/|v|$ . ec. 2.6

Con el sistema de coordenadas elegido y las definiciones de tiempos utilizadas se cumple:  $x(t) \geq 0, t \geq 0, v < 0$  y  $t_c \leq 0$ . En el comienzo de la expansión  $t_c = -L/|v|$  y cuando se produce la colisión  $t_c = 0$ .

Reemplazando la ecuación 2.6 en la ecuación 2.2 obtenemos la posición del objeto en función del tiempo a la colisión  $x(t) = v \cdot t_c$ . ec.2.7

Por lo tanto, reemplazando la ecuación 2.7 en la ecuación 2.1 obtenemos la ecuación para el tamaño angular en función del tiempo a la colisión:

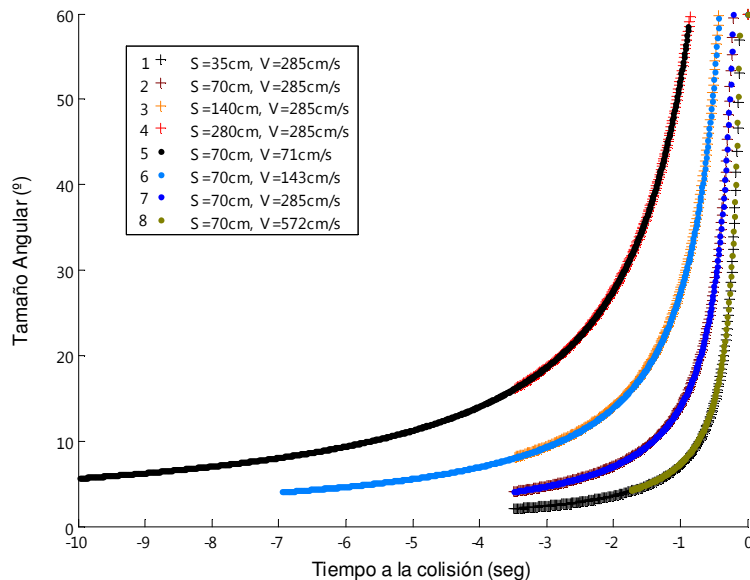
$$\tan(\theta/2) = \frac{R}{v \cdot t_c} = \frac{R/v}{t_c}. \quad \text{ec.2.8}$$

De la ec. 2.8 podríamos concluir que si usamos el tiempo a la colisión, entonces la dinámica de expansión queda unívocamente determinada por el parámetro  $\gamma = R/v$  (Gabbiani et.al. 1999).

### Número de parámetros relevantes para describir la colisión:

En la ecuación 2.8 se ve que la dinámica de expansión queda unívocamente determinada por el parámetro  $\gamma = R/v$ . Esto valdría si todos los estímulos parten desde  $t_c = -\infty$  y por lo tanto  $\theta(t=0) = 0$ . Pero cuando aplicamos estímulos más realistas el tiempo de adquisición no es infinito, entonces se puede dar el caso de tener dos valores iguales del parámetro  $\gamma = R/v$  (mantenemos  $L$  constante) y por ejemplo dos valores de  $\theta_0$  distintos. Este caso se da por ejemplo con los pares de estímulos (4, 5), (3, 6), (2, 7) y (1, 8) de la tabla 2.1.

En la figura 2.5 mostramos el tamaño angular de los 8 estímulos en función del tiempo a la colisión. Como se ve, los pares de estímulos con igual valor de  $\gamma = R/v$  parten de distintas condiciones iniciales pero luego de un tiempo sus dinámicas son las mismas. Esta observación tomará importancia en análisis posteriores.



**Figura 2.5:** A) Distintas dinámicas de expansión del tamaño angular  $\theta$  en función del tiempo a la colisión para los 8 estímulos loomings de la tabla 2.1. Como se ve en la figura, para los pares de estímulos (4 y 5), (3 y 6), (2 y 7) y (1 y 8) de la tabla 2.1, el valor del parámetro  $\gamma$  es el mismo pero las expansiones parten desde distintos tamaños iniciales. A partir de un determinado valor angular, las expansiones con igual valor del parámetro  $\gamma$  son las mismas.

### 2.3.2- Estímulos que se alejan a velocidad constante:

Durante la tesis estudiaremos la respuesta de *Chasmagnathus* a estímulos que se alejan a velocidad constante (también denominados *estímulos receding*).

En este caso, la posición del animal será  $x(t) = x_0 + |v| \cdot t$ . Y la posición inicial  $x_0$  se obtiene de pedir que el tamaño angular en esta posición sea el máximo que se puede generar con el monitor (cuyo valor es  $60^\circ$ ). La ecuación que describe el tamaño angular en función del tiempo será:

$$\tan(\theta/2) = \frac{R}{x_0 + |v| \cdot t} \quad \text{ec.2.9}$$

Para un valor de  $R$  y  $v$  fijos, la dinámica del alejamiento será la misma que la de acercamiento pero invertida temporalmente.

### 2.3.3- Relación entre el tiempo a la colisión y las variables angulares.

Si definimos  $\varphi = \theta/2$  (ver figura 2.3) entonces  $\tan(\varphi) = R/x$  y derivando a ambos lados respecto del tiempo obtenemos:  $-(1/\cos^2(\varphi)) \cdot \dot{\varphi} = -(R/x^2) \cdot \dot{x}$ , y usando  $\sin(\varphi)\cos(\varphi)/2 = \sin(2\varphi)$  y la definición de tiempo a la colisión como  $t_c = x/\dot{x}$ . Llegamos a la siguiente expresión que relaciona el tiempo a la colisión a partir de medidas angulares:

$$t_c = \sin(2\varphi)/2\dot{\varphi} = \sin(\theta)/\dot{\theta} \quad \text{ec. 2.10}$$

### 2.3.4- Otros estímulos visuales utilizados.

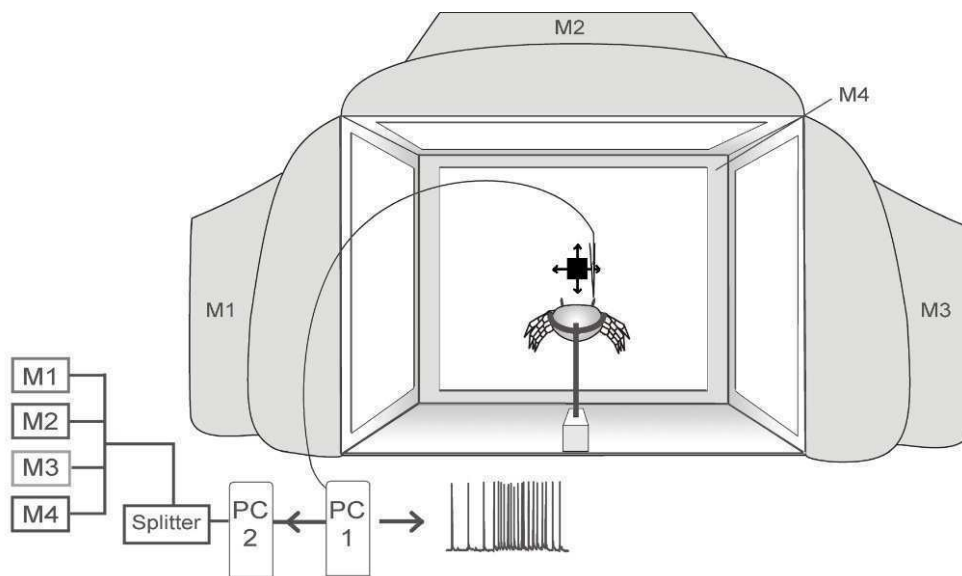
**Estímulos con movimiento lateral a velocidad constante:** El estímulo con movimiento lateral utilizado consiste en un cuadrado de  $15^\circ$  de lado que se desplaza a una velocidad de  $48^\circ/\text{seg}$  durante un segundo.

**Pulso de luz:** Consistió en un pulso de 1seg de duración y una intensidad de  $7\text{W}/\text{m}^2$  medida en la superficie del ojo del cangrejo. Este estímulo es generado por una lámpara de Xenón ubicada fuera de la jaula de Faraday cuya luz es conducida hasta unos 10cm del ojo de registro por una fibra óptica. Un obturador electromagnético gatillado por la PC1 controló el inicio y final del pulso de luz. A pesar de ser un estímulo poco fisiológico, las respuestas al pulso de luz son utilizadas como

carácter diagnóstico de muchas neuronas visuales. Por otro lado, la iluminación masiva del ojo permitió identificar neuronas visuales con relativa independencia de su campo receptivo.

## 2.4- Setup de Electrofisiología.

El setup de electrofisiología, consiste en una caja de Faraday cubierta por arriba y en tres de sus costados con tela negra para prevenir la estimulación visual no controlada desde el exterior. Dentro de la caja se ubican cuatro monitores iguales a los del dispositivo para medir el comportamiento (ver figura 2.7). En este caso no se encuentra el monitor posterior para que el experimentador pueda acceder con los equipos de registro. El monitor superior cuelga de la caja de Faraday y los otros tres están apoyados sobre una mesa antivibratoria. Por delante de los monitores se colocó una malla metálica para atenuar el ruido eléctrico provocado por ellos.



**Figura 2.7. Dispositivo experimental.** El setup de electrofisiología está montado sobre una mesa antivibratoria y rodeado por una caja de Faraday de paredes sólidas y una cortina por delante para crear un entorno visual perfectamente aislado. El dispositivo para estimulación consiste en un arreglo de cuatro monitores colocados a los lados, al frente y por encima del animal (M1 a M4). El cangrejo es mantenido en el centro del arreglo y sujetado por una pinza metálica a un estativo. La administración de imágenes y adquisición de datos se realiza con dos PC. La PC1 es utilizada para el registro de la actividad comportamental o electrofisiológica, así como para gatillar a la PC2. La PC2 (utilizando el programa Presentation 5.3) genera las imágenes que se proyectan en los monitores. La señal de video es enviada a un separador de señales (splitter) de cuatro canales con interruptores controlables manualmente desde afuera de la caja de Faraday. De esta manera, se puede seleccionar cuál o cuales monitores van a mostrar la señal en cada momento sin perturbar al animal.

Los estímulos visuales (exactamente iguales a los utilizados en los experimentos comportamentales) pueden aplicarse en cualquiera de los cuatro monitores localizados dentro de la caja de Faraday. Mediante interruptores localizados fuera de la caja, se envió o no la señal de video a cada monitor. De esta forma, se decidió cuál o cuáles de los monitores presentaban una imagen y se pudo explorar así el campo receptivo neuronal sin perturbar al animal.

Como se muestra en la figura 2.7, la PC2 desencadenaba la presentación de estímulos de expansión, mientras la PC1 realizaba la adquisición de datos neuronales.

Las señales eléctricas del potencial de membrana neuronal, se amplificaron (Axoclamp 2B, Axon Instruments), digitalizaron a 10kHz (Digidata 1322A, Axon Instruments) y adquirieron con Clampex (pClamp9).

En este dispositivo es necesario sincronizar la estimulación visual de la PC2 con los registros neuronales de la PC1. Para esto el programa pClamp9 enviaba un pulso TTL (vía puerto paralelo) desde la PC1 a la PC2. Esto permitió alinear el curso temporal de los estímulos con el registro de las respuestas electrofisiológicas.

### **Preparación electrofisiológica**

Para el registro intracelular de neuronas de los lóbulos ópticos de *Chasmagnathus* se aprovechó el duro exoesqueleto del cangrejo, sujetándolo firmemente con una pinza que lo toma por los lados del caparazón (fig. 2.8 A). De esta forma el animal quedaba completamente fijo aunque conservaba la posibilidad de mover las patas. Las quelas se sujetaron con una banda de goma para impedir que con ellas tome el electrodo y minimizar movimientos que podían desestabilizar el registro (fig. 2.8 B). Los pedúnculos oculares se fijaron al caparazón con pegamento acrílico rápido (La Gotita) con un ángulo de entre 70-80° respecto a la horizontal. (Pese a que el ángulo natural de los ojos cuando el animal se encuentra sobre un sustrato plano es de 50°, un ángulo un poco mayor aumenta mucho la eficiencia de los registros ya que el tejido nervioso se alinea más paralelamente a la trayectoria del electrodo). Luego se pegaron ménsulas metálicas a los pedúnculos para reforzar su fijado y aumentar la estabilidad del registro (fig. 2.8 C).

Aunque los registros se realizaron siempre de un solo lado, se fijaron ambos ojos para asegurar que los estímulos sean percibidos por ambos ojos y que la posición de éstos sea la misma entre distintas preparaciones. (Como los pedúnculos son móviles e independientes, un animal podría retraer el pedúnculo no fijado que de esa forma no sería estimulado visualmente). Finalmente se

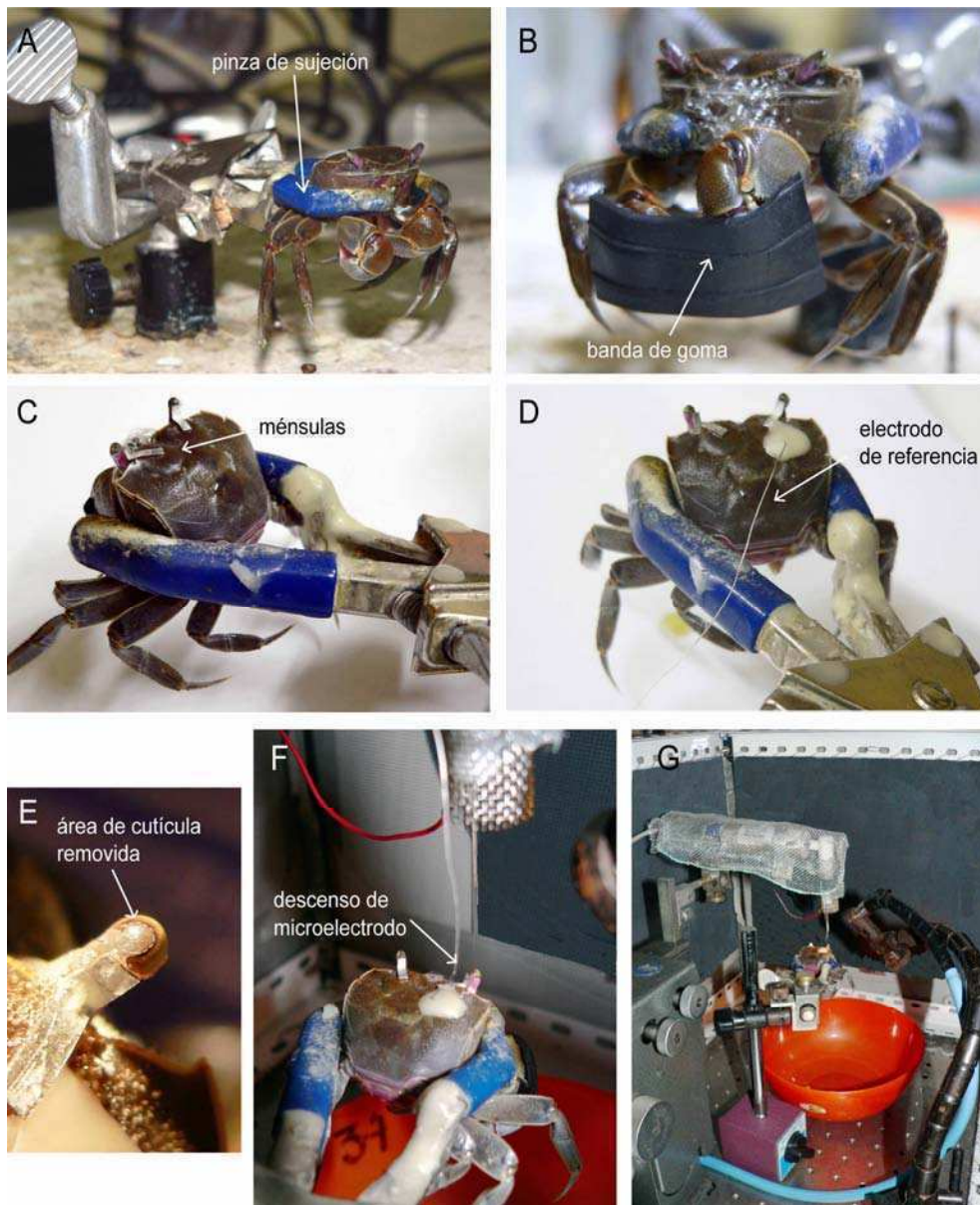
practicó un pequeño orificio en el caparazón donde se insertó el electrodo de referencia (fig. 2.8 D).

El animal fue montado en el equipo de registro (ver más adelante y fig. 2.7 G) y bajo lupa, se removió una pequeña porción de cutícula del extremo del pedúnculo en una zona libre de omatidias (fig. 2.8 E), que deja un orificio de alrededor de 500µm de diámetro. Por allí se descendió el electrodo de registro (fig. 2.8 F). La penetración de las neuronas se hizo sin visualización de los elementos a registrar. Todos los registros se efectuaron en el potencial de reposo de la membrana.

Para los electrodos se utilizaron capilares de vidrio de borosilacato (Kwik-Fil, World Precision Instruments, Inc. Florida, USA) de 1,2mm de diámetro externo y 0,68mm de diámetro interno. Los capilares se estiraron con un *puller* Sutter P77 obteniendo resistencias de 40-60 MΩ cuando éstos eran llenados con KCl 3M.

Luego de posicionado el electrodo, el orificio de entrada fue sellado con vaselina sólida para evitar la pérdida de hemolinfa y amortiguar los movimientos producidos por el latido del corazón.

Cabe destacar que durante todo el procedimiento el animal no estaba anestesiado, manteniendo su capacidad de procesar información visual al punto que es capaz de aprender en forma análoga a lo que lo hace durante los experimentos comportamentales (Berón de Astrada *et al.*, 2001, Tomsic *et.al.* 2003). En la casi totalidad de los casos los animales permanecieron varias horas en perfectas condiciones y luego de finalizados los experimentos y liberados de la pinza, reasumieron su actividad normal y (pese a tener los pedúnculos fijos) su conducta no era distinguible de la de los animales naive.



**Figura 2.7: Preparación del cangrejo para registros intracelulares.** A. El animal es sujetado con una pinza por los lados del caparazón. B. El movimiento de las quelas se previene pegándolas entre sí con una banda de goma. C. Los pedúnculos oculares se pegan al caparazón con cemento instantáneo y se aplican ménsulas metálicas por detrás para aumentar su estabilidad mecánica. D. El electrodo de referencia se inserta en el caparazón del animal mediante la realización de un pequeño orificio, que luego es sellado con cera. E. Área de la cutícula de los pedúnculos que será removida para tener acceso a los lóbulos ópticos. F. El animal es montado en el setup de electrofisiología, la foto muestra el descenso de un microelectrodo hacia los lóbulos ópticos. G. Vista general del cangrejo en el setup, se observan dos de los monitores de estimulación y el microelectrodo y preamplificador cubiertos por malla metálica para atenuar el ruido eléctrico proveniente de los monitores. (Figura modificada a partir de Medan 2008a).



## 2.5- Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos utilizados en esta tesis se implementaron con el software Matlab. Cuando se realizaron comparaciones entre grupos, primero testeamos normalidad con el test de Lilliefors. Siempre que fue posible, utilizamos tests paramétricos (test de Student en el caso de dos grupos). En los casos donde no se cumplió normalidad en alguno de los grupos, realizamos comparaciones no paramétricas utilizando el test de Kruskal-Wallis. Cuando se realizaron ajustes de funciones por cuadrados mínimos primero testeamos si los datos provenían de una distribución gaussiana utilizando nuevamente el test de Lilliefors. Por ejemplo, en los ajustes de velocidades medias o tasas de disparos neuronales solo se utilizaron datos donde las distribuciones de los datos pasaron el test.

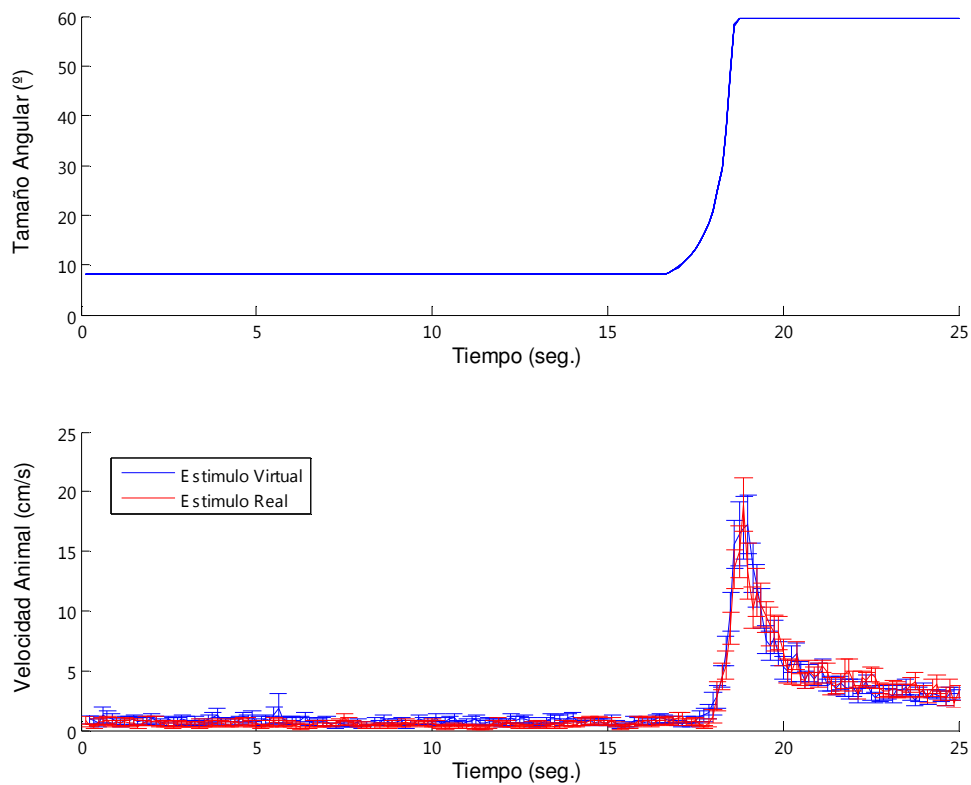
En algunos análisis utilizamos el método de bootstrap para estimar intervalos de confianza y testear hipótesis (Wasserman 2004). Este método computacional, permite obtener una distribución aproximada de algún estadístico de interés (en nuestro caso lo utilizamos para obtener intervalos de confianza para: coeficientes de correlación  $\rho$  (sección 4.4 y 6.1), parámetros de los modelos y los errores de predicción de modelos alternativos (sección 5.3.4)). Supongamos que tenemos  $N$  datos medidos, entonces para construir la distribución aproximada del estadístico de interés, el método bootstrap toma  $N$  datos al azar (con reemplazo) a partir de los datos medidos y calcula un valor del estadístico. Este proceso se repite  $N_{boot}$  veces (generalmente  $N_{boot} = 100$ ) para obtener una distribución del estadístico. Con la distribución del estadístico, podemos calcular los intervalos de confianza y/o realizar algún test de hipótesis.

En los registros de velocidad y tasa de disparo neuronal utilizamos métodos de filtrado con ventana temporal cuadrada de ancho  $T_{filtro}$ . Estos filtrados son comúnmente utilizados (Gabbiani et al. 1999) para alisar las fluctuaciones aleatorias de corto término y resaltar las tendencias de más largo término. Esto mejora la interpretación de los registros, pero se debe ser cuidadoso de no alisar detalles relevantes de la respuesta. En los casos donde el filtrado pudiera afectar los resultados (por ejemplo en los ajustes de la sección 5.3.4 y de la sección 6.2.1) estudiamos su influencia (por ejemplo utilizando  $T_{filtro}$  en 100, 50 o 25 ms) y evaluar si nuestras conclusiones no se veían afectadas por utilizar una ventana temporal de 100 ms.

## Apéndices Capítulo 2

### Apéndice 2.A - Comparación de un estímulo real y uno simulado.

Para evaluar si una simulación da resultados similares a un objeto real se construyó un dispositivo que acercaba un cartón cuadrado negro al animal. Se generó un estímulo real con  $v=12$  cm/s,  $L=20$ cm y  $R=1.45$ cm. Se hizo una simulación con esos parámetros y se obtuvieron respuestas similares (ver figura 2.A.1). Los estímulos fueron aplicados desde el costado derecho del animal. Con este experimento mostramos que para esta condición los efectos de binocularidad son despreciables. De este modo, ante objetos que se acercan desde un costado, el animal parece generar su respuesta utilizando información monocular.



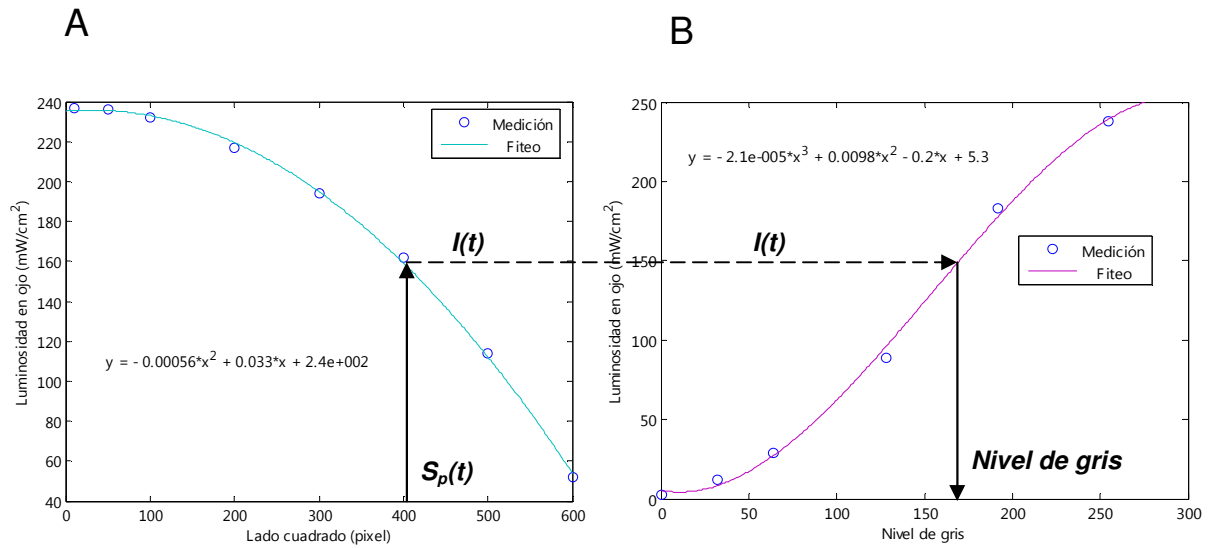
**Figura 2.A.1. Respuestas a un estímulo de aproximación a velocidad constante real y simulado.** (Arriba) Tamaño angular del cuadrado en expansión para el estímulo real y el simulado. (Abajo) Velocidad media de los animal para el estímulo real (trazo rojo, media  $\pm$  error estándar) y para el estímulo virtual (trazo azul).  $N=18$  animales, se aplicaron los dos estímulos a cada animal.

## Apéndice 2.B – Calibración de intensidad luminosa.

En la figura 2.B.1, mostramos la calibración de intensidad de luz medida en la posición donde se encuentra el ojo del cangrejo para cuadrados de distintos tamaños, también mostramos la luminosidad en el mismo punto para distintos niveles de grises aplicados en toda la pantalla. El objetivo de esta calibración está asociado al experimento de la sección 3.3.

### Construcción del estímulo de oscurecimiento.

Dado un estímulo looming  $\theta(t)$  aplicado en el monitor de la derecha (ver sección 2.3) se puede generar un estímulo  $I(t)$  que produzca la misma luminosidad en el ojo, pero que no contenga bordes en movimiento. El estímulo con variación de luminosidad (pero sin componente de movimiento de bordes) se genera del siguiente modo: Partimos de la curva  $s_p(t)$  (ver ec. 2.4) y con la calibración de la figura 2.C.A calculamos la luminosidad en el ojo del cangrejo al tiempo  $t$ . Una vez que tenemos la luminosidad, calculamos el nivel de gris equivalente al cuadrado negro utilizando la figura 2.C.B. Este nivel de gris consiste en un número en el rango  $[0,255]$ .



**Figura 2.C.** A) Intensidad de luz medida en la posición del ojo del animal cuando se aplican cuadrados negros de distintos tamaños en un fondo blanco. B) Intensidad de luz medida en la posición del ojo del animal cuando se aplican distintos niveles de grises en toda la pantalla de un monitor. Con la información de estos dos gráficos podemos generar un estímulo  $I(t)$  que tenga la misma luminosidad en el ojo que la correspondiente a un estímulo de expansión, pero que no contenga bordes en movimiento.

### **Capítulo 3 - Descripción de la respuesta comportamental a estímulos de colisión.**

En el capítulo 1 vimos que el comportamiento de los cangrejos en su ambiente natural es complejo e involucra varios procesos de toma de decisión donde juegan un rol preponderante las informaciones relacionadas a los predadores, la cueva, los vecinos y el horizonte. El estudio del animal en su ambiente natural (enfoque etológico) permite revelar cuales son las variables importantes para entender el comportamiento de un animal. Sin embargo, este enfoque tiene una dificultad: las condiciones de estimulación no se pueden controlar y por lo tanto presentan un alto grado de variabilidad. Además la medición precisa de ciertos parámetros de las respuestas conductuales suelen ser difíciles de alcanzar.

Para resolver esta dificultad es útil adoptar un enfoque de trabajo en el laboratorio que consiste en simplificar (o empobrecer) el estímulo visual a un conjunto reducido de parámetros que nos permitan entender cuales son las claves visuales preponderantes y como estas afectan el comportamiento. Para ello es fundamental encontrar estímulos que produzcan respuestas de intensidad similar a las encontradas en la naturaleza.

En este capítulo haremos una caracterización general de la respuesta de *Chasmagnathus* a distintos estímulos visuales para hallar las condiciones de estimulación que generan respuestas intensas y consistentes en el animal.

Respecto a la respuesta comportamental de escape describiremos los siguientes parámetros:

- 1) la trayectoria desarrollada por el animal.
- 2) el momento de inicio de la respuesta.
- 3) la dirección de traslación del animal.
- 4) la velocidad de traslación.

Con el dispositivo diseñado se pueden modificar numerosas propiedades del estímulo visual. Nos concentraremos en las siguientes:

- 1) la dirección de donde proviene el estímulo.
- 2) la dinámica temporal de la traslación o expansión.
- 3) el contraste del objeto simulado.

### 3.1- Fases en la dinámica y direccionalidad del escape.

En su respuesta a los estímulos looming *Chasmagnathus* transiciona entre distintos estados comportamentales. De la observación de muchas respuestas individuales, llegamos a la conclusión de que las fases o estados comportamentales.

- **Caminata (C):** Esta fase se caracteriza por una caminata espontánea sin dirección preferencial mientras el animal se desplaza a velocidad aproximadamente constante.
- **Quieto (Q):** Si el animal está inicialmente caminando al comenzar la estimulación visual, se detiene durante un tiempo. Esta fase puede deberse a una estrategia de freezing (ver sección 1.1.3) y/o a que el cangrejo debe reajustar su patrón motor para cambiar de dirección y moverse hacia el lado contrario al foco de expansión del estímulo.
- **Escape (E):** Esta fase se caracteriza por un movimiento en dirección contraria al estímulo. El animal parece variar su velocidad en función de la expansión.
- **Desaceleración (D):** Luego de que el estímulo deja de expandirse, el animal continúa alejándose del mismo y su velocidad va disminuyendo.

En la figura 3.1.A mostramos como ejemplo la trayectoria de un animal y en la figura 3.1.B la velocidad instantánea del animal y el tamaño angular del estímulo en función del tiempo en que se produjo la expansión desde el monitor de la derecha.

Usamos un código de colores para representar los periodos de la estimulación y la correspondiente actividad locomotora del animal.

En azul se muestra el estado de actividad del animal antes de comenzar la expansión: en este caso el cangrejo caminaba a velocidad constante y su dirección de desplazamiento era hacia atrás y a la izquierda (definiremos este estado como *fase de caminata* ‘C’).

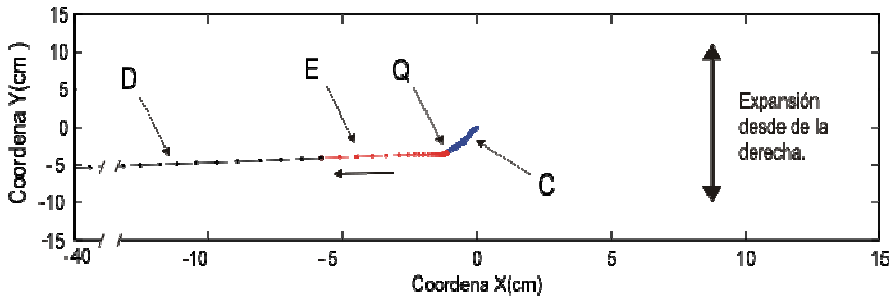
En rojo se muestra el estado del animal cuando se produjo la expansión. En este caso se ve que el animal mantuvo su estado anterior durante un segundo aproximadamente, luego se quedó quieto un tiempo (*fase quieto* ‘Q’) para luego escapar en la dirección contraria al foco de expansión (*fase de escape* ‘E’). También podemos apreciar que durante el escape el animal aumenta gradualmente su velocidad.

Finalmente en negro se muestra que cuando la expansión terminó, la velocidad del animal decayó rápidamente (*fase de desaceleración* ‘D’).

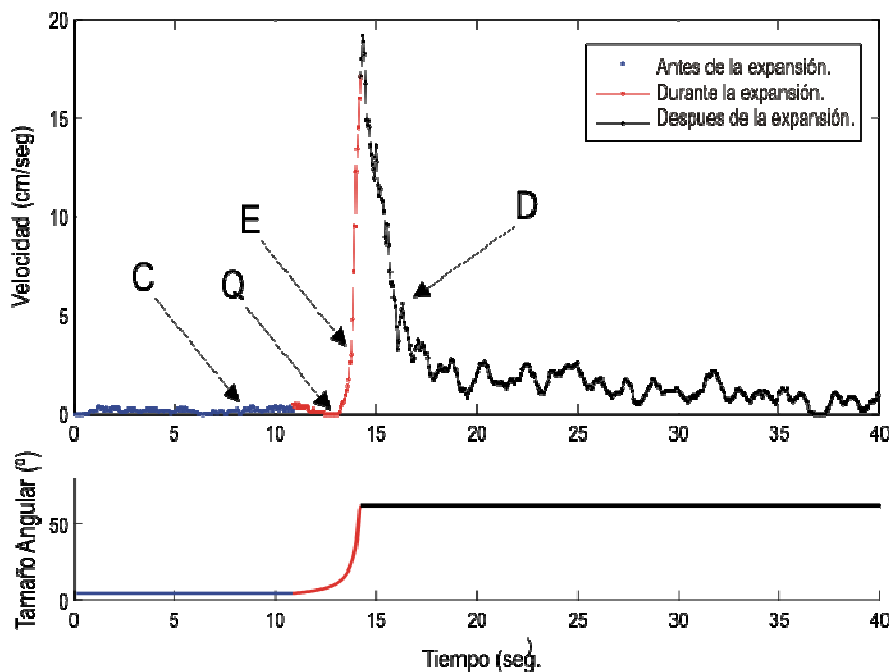
El análisis cualitativo de las respuestas de muchos animales a estímulos loomings de velocidad constante revelaron estas secuencias: Si el animal está inicialmente quieto: la secuencia de estados

de la respuesta es  $\{Q \rightarrow E \rightarrow D \rightarrow C \rightarrow Q\}$ . Si el animal está caminando antes de comenzar la expansión, observaremos la secuencia es  $\{C \rightarrow Q \rightarrow E \rightarrow D \rightarrow C \rightarrow Q\}$ .

**A**

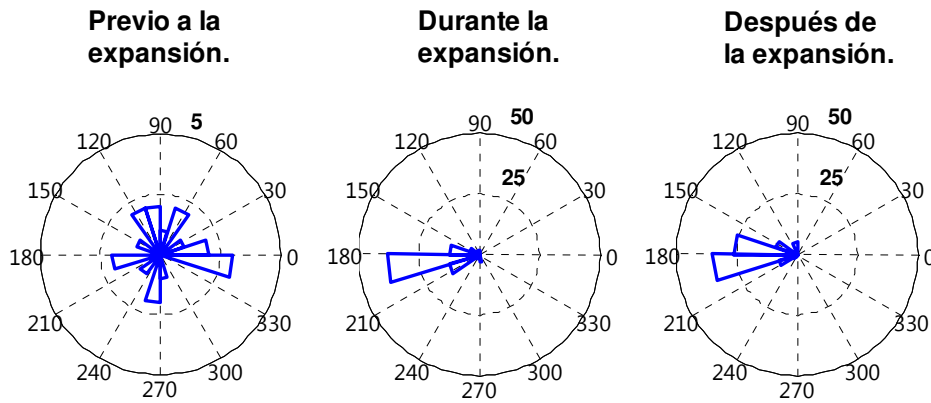


**B**



**Figura 3.1. Ejemplo de la respuesta de un animal a un estímulo looming:** a\_todos2\_140209\_fasesxy2b.m .Animal 2. Trayectoria y Velocidad instantánea en función del tiempo de estimulación. Se utilizó el estímulo 2 ( $S=70$  cm y  $V=285$  cm/s, para más información ver capítulo 2). (A) Trayectoria del animal cuando se aplicó el estímulo de expansión desde el monitor de la derecha. Previo al estímulo looming, el animal estaba caminando en dirección oblicua (fase C). Luego de comenzar la expansión el animal se quedó quieto (fase Q), para después escapar dirección contraria al estímulo (fase E). Cuando la expansión finalizó el cangrejo disminuyó su velocidad (fase D) manteniendo una dirección opuesta al estímulo. (B) Velocidad instantánea del animal en función del tiempo. Las flechas indican las distintas fases mencionadas. El panel inferior representa el tamaño angular del cuadrado negro en función del tiempo. Código de colores: En azul se muestra el estado del animal antes de comenzar la expansión, en rojo durante expansión y en negro una vez finalizada la misma. Registros comportamentales filtrados con ventana de 200ms.

En la figura 3.2 mostramos los histogramas de las direcciones de desplazamiento del cangrejo antes, durante y luego de la expansión (correspondientes a los trazos azules, rojos y negros de la figura 3.1). Como se puede apreciar, previo al comienzo el expansión no hay una dirección preferida mientras que durante y después de la expansión los escapes son altamente direccionales.



**Figura 3.2. Histogramas de direcciones de las trayectorias antes, durante y luego de la expansión cuando se estimula desde la pantalla derecha.** Los histogramas polares de direcciones representan el numero de animales caminando en cada dirección con un bino de 15° (N=90 animales, 1 trial por animal, se analizaron las trayectorias donde la distancia recorrida superó los 2cm). (Izquierda) Histograma de direcciones de escape previo al comienzo de la expansión (trazo azul en la figura 3.1). De los 90 animales utilizados solo 20 se encontraban caminando y recorrieron distancias mayores a 2cm. (Centro) Histograma de direcciones de escape durante la estimulación (trazo rojo en la figura 3.1, n=90 animales). (Derecha) Histograma de direcciones después de la estimulación (trazo negro en la figura 3.1, n=90 animales).

### 3.2 – Estimulación repetida.

En algunos de los experimentos resulta conveniente poder medir varias respuestas de un mismo animal. Sin embargo las respuestas repetidas pueden verse afectadas por fenómenos de habituación o de cansancio. En este experimento queremos estudiar con que intervalo entre ensayos (ITI, del inglés inter trial interval) podemos medir las respuestas sin que estas se vean afectadas por lo efectos antes mencionados.

Para este estudio estimulamos a los animales con la misma dinámica temporal de expansión (R=35cm , V=285cm/s, L=10m). La estimulación siempre se efectuó desde el monitor de la derecha. Se utilizaron dos grupos de animales a los que estimulamos con un intervalo entre

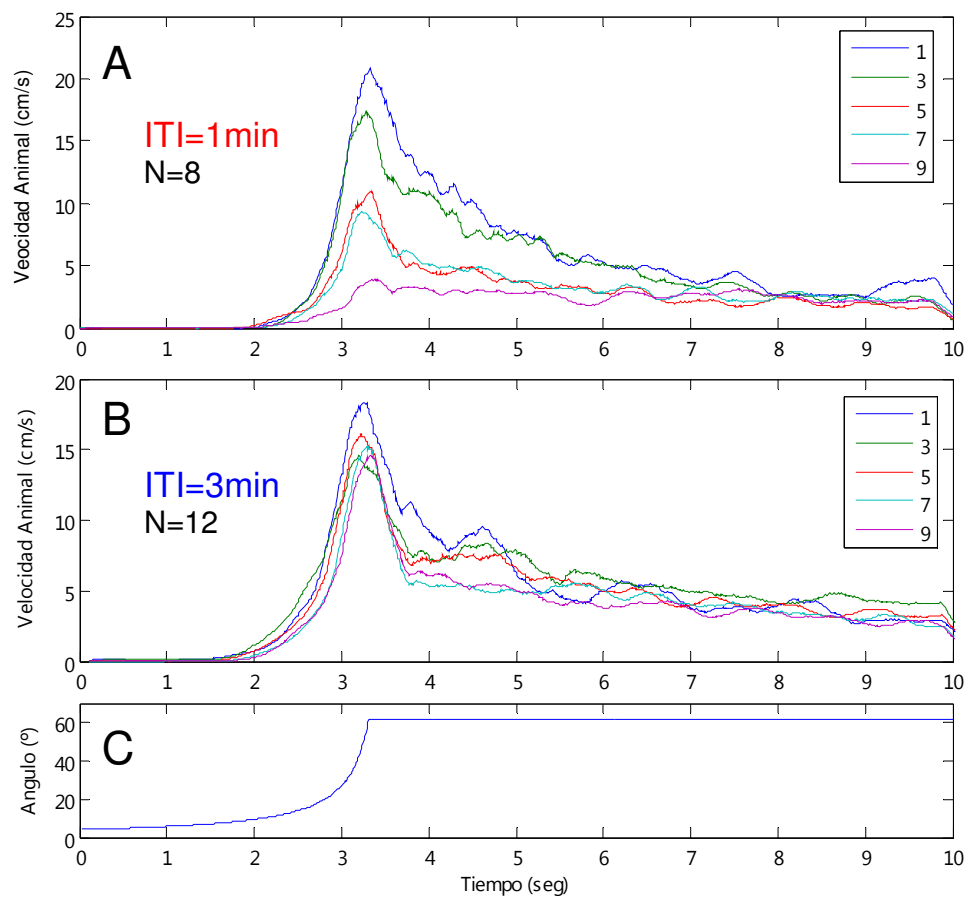
ensayos (ITI) de 1 minuto o 3 minutos. Se aplicaron 10 estimulaciones a cada animal. Además para simplificar el análisis no se utilizaron los registros en donde los animales se encontraban caminando antes de comenzar la expansión.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 3.3 donde graficamos la velocidad media de los animales en función del tiempo para los ensayos 1, 3, 5, 7 y 9. Podemos apreciar que la variación en la respuesta promedio de los animal es mucho menor con un ITI de 3 minutos que con un ITI de 1 minuto.

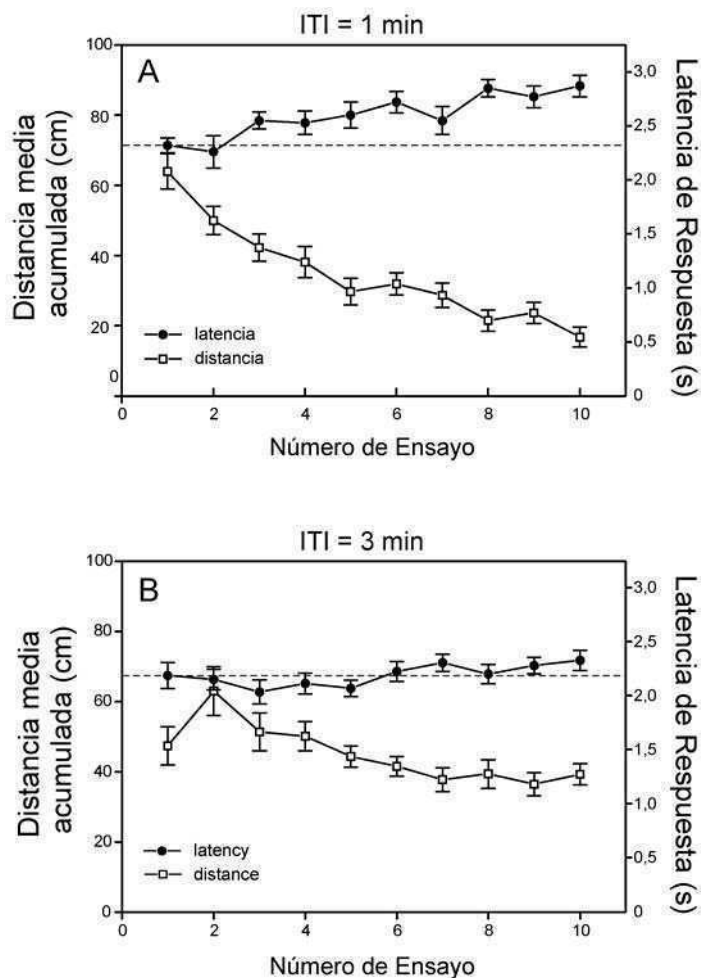
Una característica importante de la respuesta es su intensidad que definimos como la distancia recorrida en un periodo de 10 segundos. En la figura 3.4 se ve que la reducción en la intensidad de la respuesta es mucho mayor con el ITI de 1 minuto que con el de 3 minutos.

Otro parámetro importante para cuantificar es el tiempo (o latencia) transcurrido desde el comienzo de la expansión y el momento en que el animal comienza la respuesta de escape. En la figura 3.4 se puede apreciar que con un ITI de 1 minuto, la latencia para el comienzo del escape aumenta considerablemente cuando se repite el estímulo, mientras que con un ITI de 3 minutos permanece constante. Con estos resultados concluimos que un ITI de 3 minutos es aceptable para estudios que analicen la velocidad, distancia o la latencia del comienzo del escape utilizando mediciones de respuestas repetidas en un mismo animal.





**Figura 3.3: Respuesta media de los animales ante la estimulación repetida.** Velocidad media de los animales en función del tiempo, con un intervalo entre trials de 1 min (A) ó 3 min (B). (C) Dinámica de expansión utilizada en la estimulación ( $S=70\text{cm}$  ,  $V=285\text{cm/s}$ ).  $N=12$  animales por cada experimento, 10 ensayos por animal. Filtrado ventana 400ms.

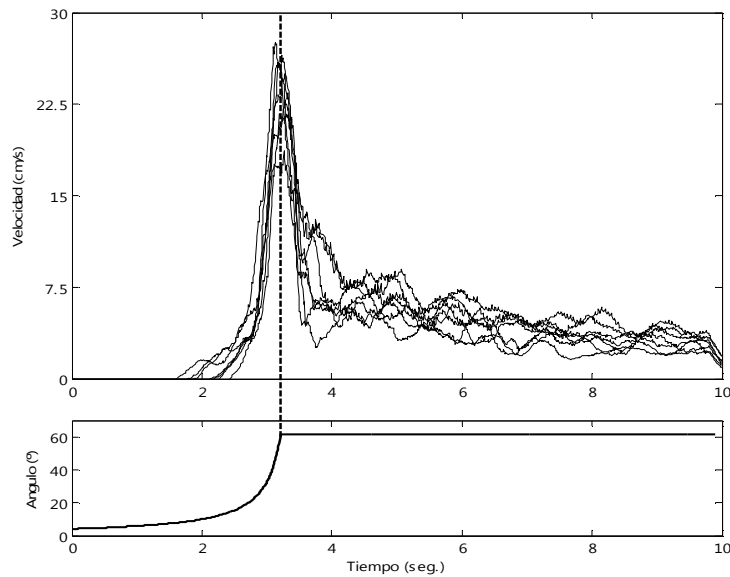


**Figura 3.4: Respuesta media de los animales ante la estimulación repetida.** (A) La estimulación repetida con un ITI=1 min disminuye la distancia recorrida por el animal y aumenta la latencia para el comienzo de la respuesta de escape. (B) La estimulación repetida con un ITI=3 min no produce cambios significativos en la distancia recorrida y en la latencia para el comienzo de la respuesta de escape. N=14 cangrejos por cada experimento. Las barras representan los valores medios  $\pm$  error estándar.

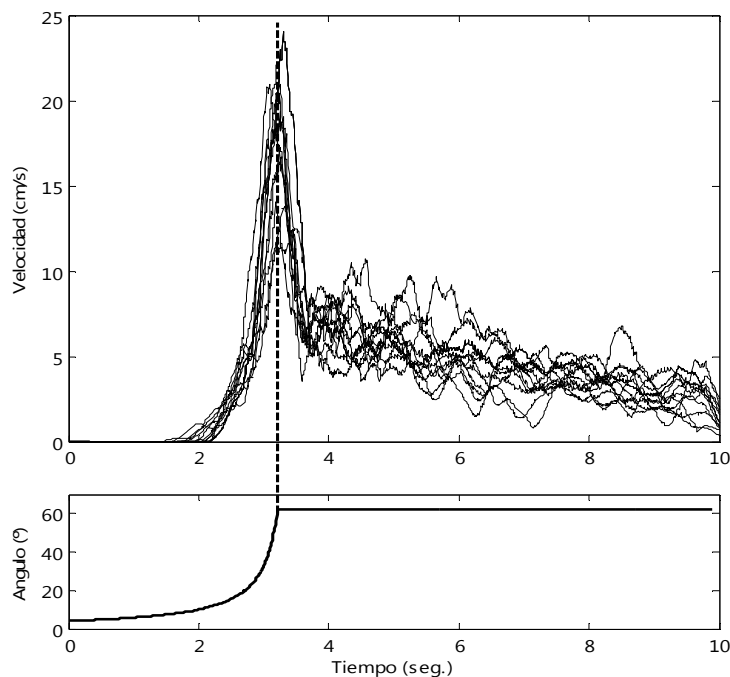
### 3.2.1- Consistencia de la respuesta en un mismo animal y entre distintos animales.

En la figura 3.5 mostramos respuestas de un mismo animal a un mismo estímulo ( $R=35\text{cm}$  ,  $V=285\text{cm/s}$  ,  $L=10\text{m}$  , 8 ensayos) con un ITI de 3 minutos. Como se ve, existe un alto grado de repetitibilidad en registros individuales de un animal.

En la figura 3.6 mostramos las respuestas de 12 animales al estímulo ( $R=35\text{cm}$  ,  $V=285\text{cm/s}$  ,  $L=10\text{m}$ ). De los 10 ensayos aplicados a cada animal se eligió el ensayo numero 5. Como se ve, también existe un alto grado de repetitibilidad entre los registros de distintos animales.



**Figura 3.5. Respuestas de un animal para un mismo estímulo repetido.** (Arriba) Velocidad del animal en función del tiempo. (Abajo) Tamaño angular del cuadrado en función del tiempo. Como se puede apreciar, con un ITI de 3 minutos existe un alto grado de repetitibilidad entre las respuestas para registros de un mismo animal. En este análisis se eliminaron los ensayos en que el animal estaba inicialmente caminando por lo que mostramos 8 ensayos de los 10 aplicados. Filtrado ventana 400ms.



**Figura 3.6. Respuesta de distintos animales para un mismo estímulo en el ensayo 5.** (Arriba) Velocidad de distintos animales en función del tiempo para el ensayo número 5. Se muestran la respuesta de 12 animales. (Abajo) Tamaño angular del cuadrado en función del tiempo. Como se puede apreciar, con un ITI de 3 minutos existe un alto grado de repetitibilidad entre las respuestas para registros de distintos animales. En este análisis se eliminaron los ensayos en que el animal estaba inicialmente caminando. Filtrado ventana 400ms.

### **3.3- Respuestas a estímulos que representan objetos que se acercan (estímulos loomings o de expansión), que se alejan (estímulos receding o de contracción) y oscurecimientos.**

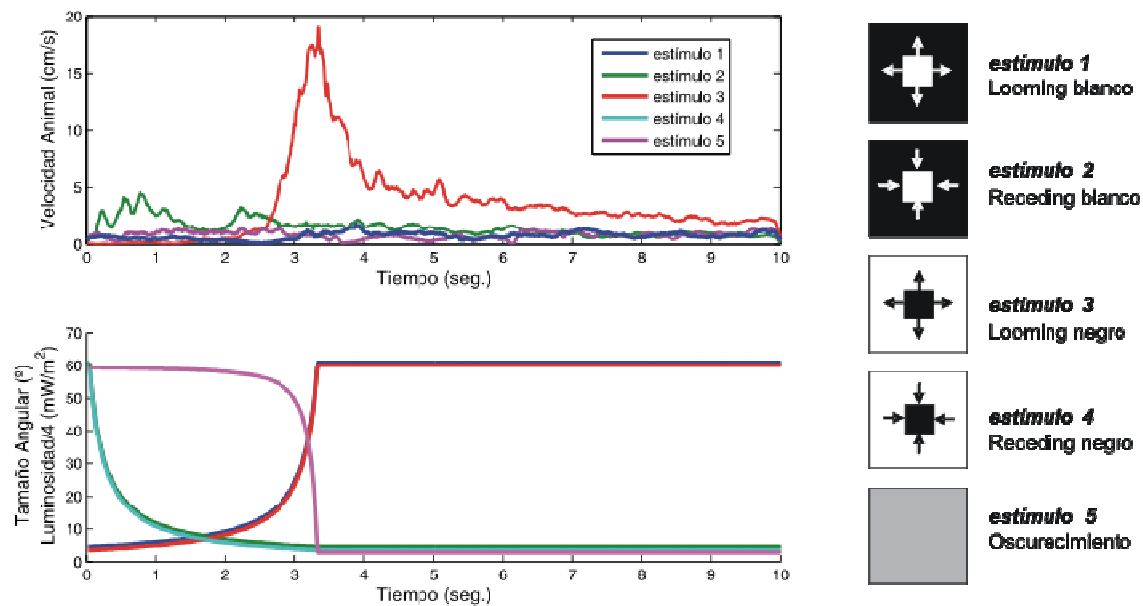
En la sección anterior mostramos que el cangrejo *Chasmagnathus* produce una respuesta intensa y consistente a los estímulos loomings en condiciones de laboratorio.

Como discutimos al comienzo de este capítulo, en los estudios de campo es muy difícil controlar los estímulos visuales que se aplican al animal. Trabajar en condiciones de laboratorio nos permite simplificar el estímulo para investigar cuales son las claves visuales que determinan la respuesta, la cual puede ser medida con mayor precisión.

Cuando un predador se acerca, la presa verá variaciones de luminosidad en una región de su campo de observación y también un conjunto de bordes que se expanden. El experimento que detallamos a continuación trata de estimar la importancia relativa de la variación de luminosidad y de la componente de movimiento en el estímulo. También nos interesa saber si el contraste de los bordes del objeto (respecto al fondo) influye en la respuesta. Para esto diseñamos expansiones y contracciones de un cuadrado negro o blanco. Además diseñamos un estímulo que produce variaciones de intensidad en el ojo que son iguales a las que produce la expansión del cuadrado negro, pero que no tiene movimientos de bordes (ver apéndice 2.B). En la tabla 3.1 se muestran las características de los estímulos simulados. Para este protocolo se estimuló siempre desde la pantalla derecha, se aplicaron los 5 estímulos a cada animal (N=14 animales) y el orden de estimulación fue al azar, con un ITI de 3 minutos. Los resultados principales respecto a la respuesta de los animales frente estos estímulos se muestran en la figura 3.7. Los animales responden preferente a estímulos con bordes que se mueven, con figuras negras, y con movimiento de expansión (correspondiente al estímulo 3). El estímulo de oscurecimiento (que genera la misma variación de luminosidad en el ojo pero sin bordes con movimiento) produce una respuesta escasa o nula. Por otro lado, los objetos claros respecto al fondo con bordes en expansión generan respuestas mucho menores que los oscuros.

Número Estímulo	R (cm)	V cm/s	L (m)	T (s)	$\theta_0$ (°)	Luminosidad Figura/Fondo (mW/m <sup>2</sup> )	Nombre
1	35	285	10	3.5	4	240 / 4	Looming blanco
2	35	285	10	3.5	4	240 / 4	Receding blanco
3	35	285	10	3.5	4	4 / 240	Looming negro
4	35	285	10	3.5	4	4 / 240	Receding negro
5	Se genera una variación de luminosidad en el ojo equivalente a la que se ve con el estímulo 2 pero sin movimiento de bordes (ver Apend. 2.B)						

**Tabla 3.1: Estímulos diseñados para estudiar la importancia relativa de la variación de luminosidad y de la componente de movimiento en el estímulo.** Los parámetros R, V, L,  $\theta_0$  y T fueron definidos en la figura 2.1.



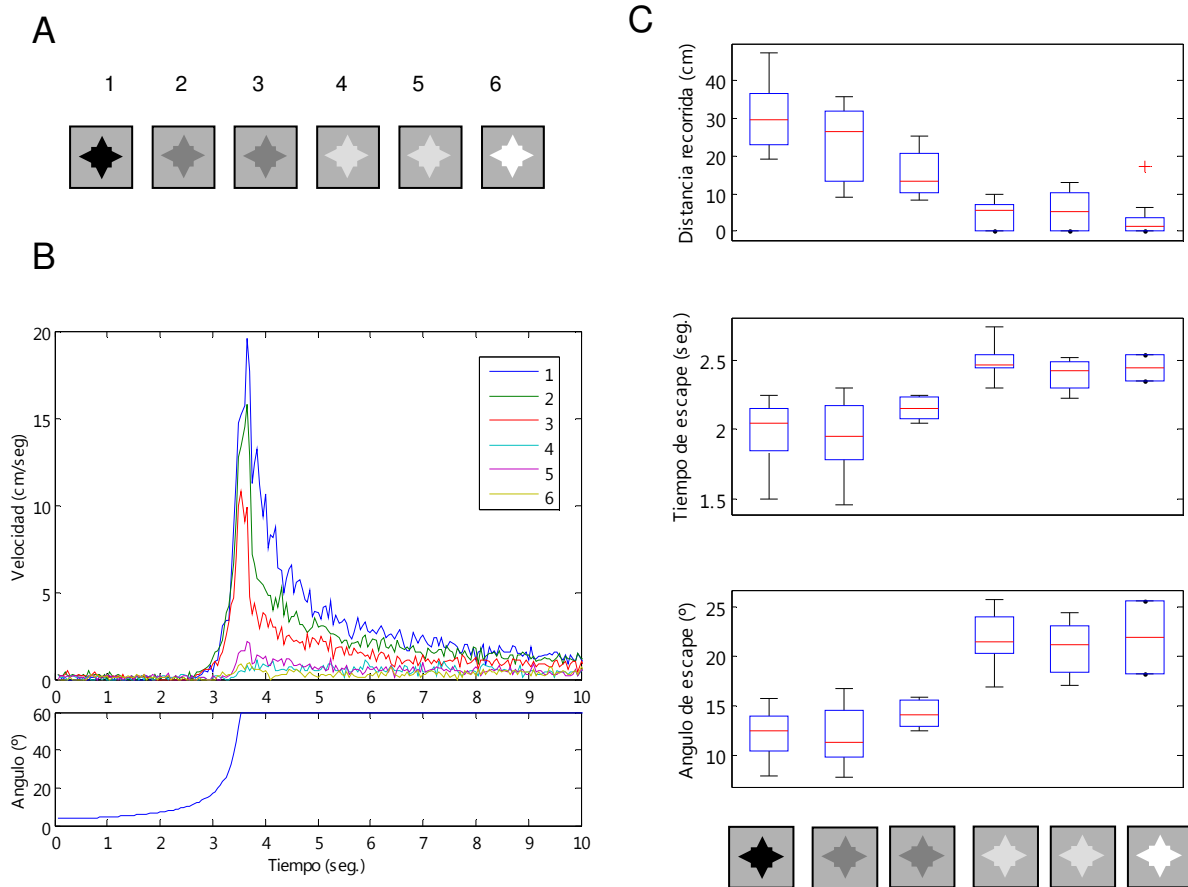
**Figura 3.7:** (Arriba) Velocidad media de los animales en función del tiempo para dinámicas de expansión (loomings) alejamientos (receding o contracciones) y oscurecimientos: Los animales responden mucho más intensamente a imágenes de objetos oscuros que se acercan en trayectoria de colisión. (Abajo) Se ilustra la dinámica temporal del tamaño angular (para los estímulos 1 a 4) y de la Luminosidad/4 (para el estímulo 5). Filtrado ventana 200 ms.

Este resultado muestra que el contraste del borde del objeto respecto al fondo influye considerablemente en la intensidad de la respuesta. Para estudiar en mayor detalle este punto, diseñamos un experimento donde el fondo tiene un valor de luminosidad fijo y el objeto es el que varía su luminosidad. Para esto se generaron 6 condiciones con distintos contrastes  $C$ , la luminosidad de fondo fue  $97\text{mW/m}^2$  y la de los objetos se muestra en la tabla 3.2. Definimos el contraste  $C = (I_{OBJ} - I_{FONDO}) / I_{FONDO}$ , donde  $I_{OBJ}$  y  $I_{FONDO}$  es la intensidad lumínica del objeto y del fondo respectivamente.

Estímulo	Intensidad (mW/ m <sup>2</sup> )	Contraste
1	6	-0.94
2	13	-0.86
3	46	-0.53
4	152	0.57
5	192	0.99
6	244	1.52

**Tabla 3.2: Estímulos de expansión con distintos niveles de luminosidad del objeto respecto a un fondo de luminosidad fijo.**

Como se observa en la figura 3.8 para los estímulos 1 y 2, las diferencias en la intensidad y latencia son muy pequeñas, de lo que concluimos que para el rango de contrastes (-1,-0.86) las respuestas no se ven afectadas. Sin embargo cuando el signo del contraste se invierte (objetos más claros que el fondo) las magnitudes de las respuestas son mucho menores y las latencias aumentan considerablemente.



**Figura 3.8: Efecto del contraste del objeto respecto al fondo para estímulos de expansión.** (A) Representación de los estímulos utilizados: la luminosidad del fondo se mantuvo constante y se varió la luminosidad del cuadrado en expansión (ver tabla 3.2). (B) Velocidad media de los animales en función del tiempo para los 6 estímulos aplicados. (C) Características importantes de la respuesta: (arriba) Intensidad de la respuesta (distancia recorrida en 10 segundos). (medio) Tiempo transcurrido entre el comienzo de la expansión y el escape. (abajo) Tamaño angular del cuadrado en expansión cuando el animal comienza el escape. Las líneas rojas representan las medianas, los cuadrados son los cuartiles inferior y superior. Las barras punteadas representan la extensión del resto de los datos. Se aplicaron los 6 estímulos a cada animal (N=12 animales).

### 3.4 – Efecto de la dirección en que se acerca el objeto sobre la respuesta de escape.

Estudiando la respuesta a estímulos loomings en drosófila, Tammero y Dickinson (2002) mostraron que se pueden activar distintas respuestas motoras modificando la ubicación del foco de expansión respecto al animal. Se observó que la probabilidad de producirse giros sacádicos era alta si el foco de expansión se producía desde la dirección lateral. Por otro lado la probabilidad de los giros disminuye a medida que el foco se acerca al centro del animal y comienza a aumentar la probabilidad de extender las patas.

Por otro lado, observaciones cualitativas en la playa, nos muestran que cuando un observador se acerca a un cangrejo sin un refugio cercano, a una distancia de varios metros el animal primero se orienta de costado para luego poder alejarse corriendo de lado en dirección opuesta al observador. Cuando el observador se acerca muy rápidamente a distancias de un metro aproximadamente, el animal se orienta de frente y levanta sus quelas en un despliegue defensivo.

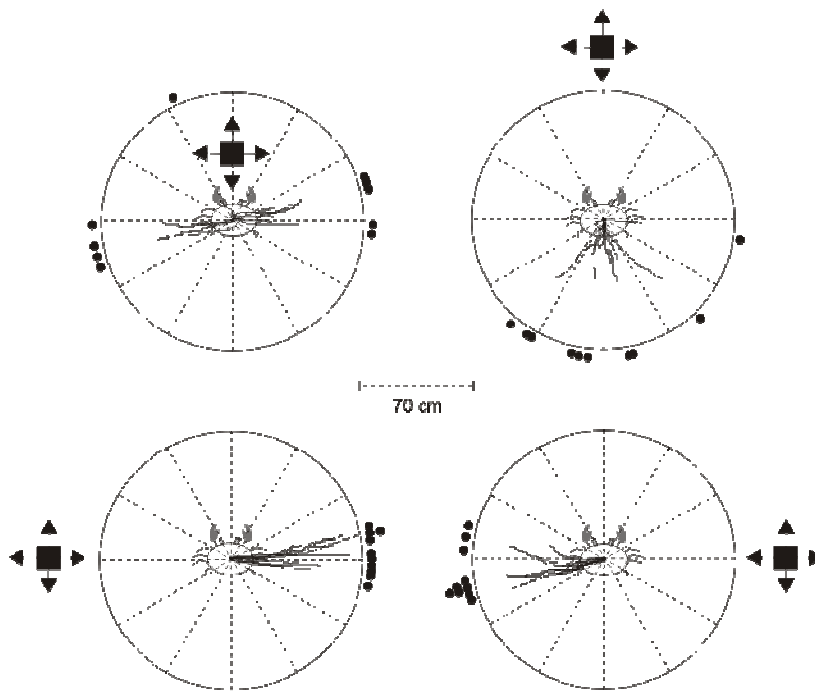
De lo anterior se desprende que los animales pueden desplegar respuestas cualitativamente distintas, dependiendo de la dirección de donde proviene el estímulo looming. Por este motivo, nos interesó caracterizar la respuesta de *Chasmagnathus* (dirección, intensidad y latencia del escape) dependiendo de la dirección donde se producía la expansión. Para impedir que la imagen se desplazara sobre la retina del animal como consecuencia de sus intentos por rotar (en particular cuando se estimulaba desde el frente) realizamos los experimentos manteniendo la condición de lazo abierto para el componente de rotación (ver métodos generales).

El protocolo del experimento fue el siguiente: Se estimuló al animal desde los monitores de derecha, frente, izquierda y arriba. La dinámica de expansión utilizada en la estimulación fue ( $R=35\text{cm}$  ,  $V=285\text{cm/s}$ ,  $L=10\text{m}$ ) con un ITI de 3 minutos. Se midieron las respuestas de 10 animales y se aplicó a cada animal las 4 direcciones de aproximación (con orden de estimulación al azar).

Como se ve en la figura 3.9, cuando los estímulos se aproximan desde los costados, la respuesta es altamente direccional, por lo que el animal puede estimar el foco de la expansión y controlar la dirección de su huida.

□



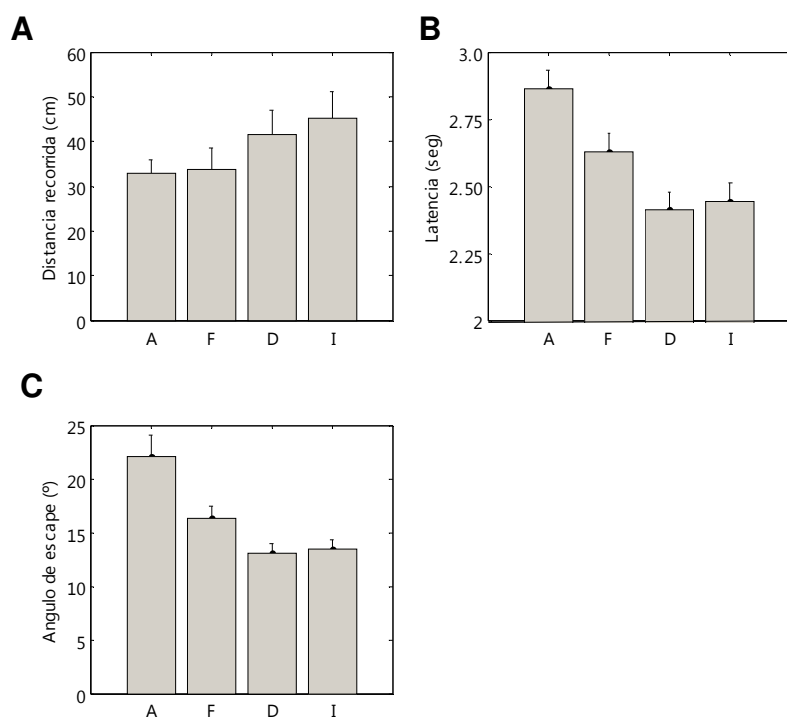


**Figura 3.9: Direccionalidad en la respuesta de escape.** El estímulo looming fue aplicado a cada animal en los cuatro monitores con un orden aleatorio de presentación. (A) Trayectorias individuales recorridas por los animales cuando estimulamos desde 4 direcciones distintas. Cuando estimulamos desde arriba el animal puede escapar hacia la izquierda o derecha (N=10 animales).

Cuando estimulamos desde arriba los animales elijen escapar a izquierda o derecha sin ninguna preferencia.

Definimos nuevamente la intensidad de la respuesta de escape como la distancia recorrida en un periodo de 10 segundos. En la figura 3.10.A, se puede apreciar que las respuestas más intensas se producen cuando estimulamos desde la izquierda o derecha, probablemente debido a la menor ambigüedad que contienen esos estímulos con relación a la elección de la dirección del escape y la no necesidad de intentos de rotación previos a la carrera.

Respecto a la decisión del momento de comenzar el escape, vemos que también depende de la dirección de donde proviene el estímulo. Como se ve en la figura 3.10.B, cuando estimulamos desde arriba los animales demoran más en escapar, de este modo, el tamaño angular en el escape aumenta considerablemente respecto al valor obtenido con expansiones desde los monitores laterales (ver figura 3.10.C).



**Figura 3.10: Respuestas de los animales a expansiones desde distintas direcciones.** (A) Distancia recorrida durante 10 segundos. La respuesta cuando estimulamos desde los monitores laterales es mayor que desde el centro o arriba. (B) Cuando estimulamos desde arriba los animales comienzan el escape más tarde. (C) Tamaño angular del cuadrado cuando el animal comienza el escape. Los valores se muestran como medias  $\pm$  error estándar. Se aplicaron los 4 estímulos a cada animal y se utilizaron 10 animales.

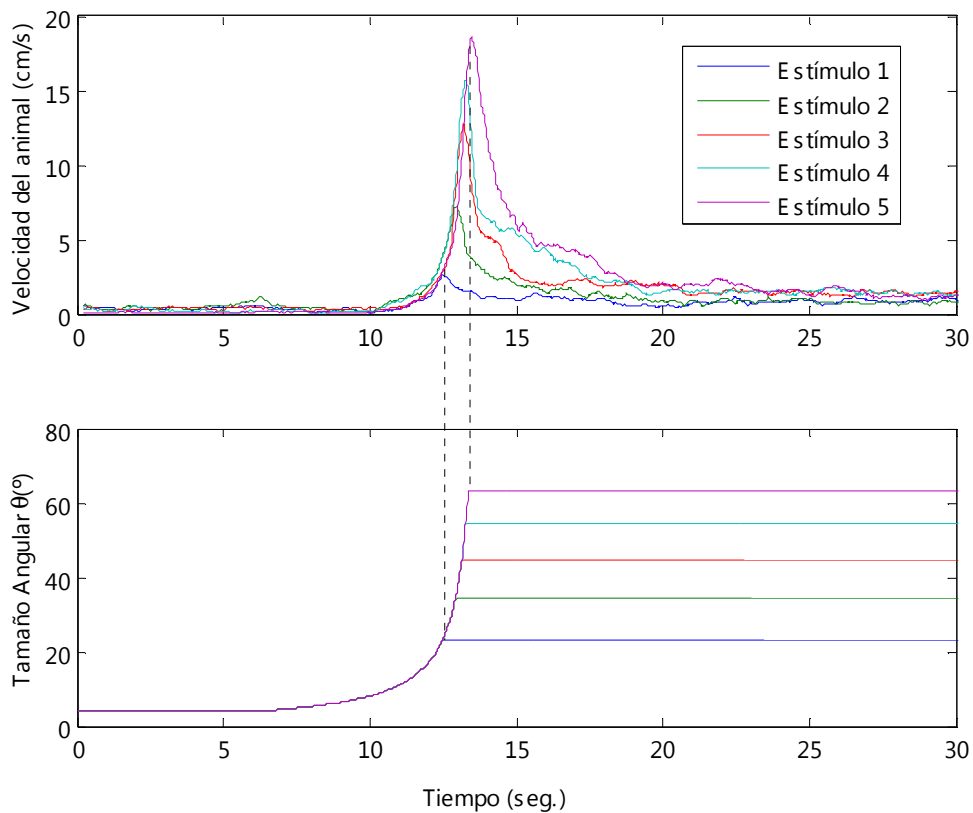
Cabe preguntarse porque las respuestas a estímulos dorsales se realizan con una mayor latencia. Esto puede deberse a dos razones. La primera es que *Chasmagnathus* tiene una resolución angular mayor alrededor de la línea de horizonte ( $\Delta\rho=1^\circ$  aprox.) mientras que en la parte superior del ojo la resolución cae a  $\Delta\rho=2^\circ$  (Berón de Astrada comunicación interna). La segunda posibilidad es que cuando estimulamos desde arriba, no resulta obvio para el animal decidir en que dirección escapar y el proceso de toma de decisión produciría un incremento en la latencia de inicio del escape.

### 3.5- Primera evidencia sobre el control de la velocidad de escape.

Como describimos en la sección 1.1.2, las respuestas visuomotoras a los estímulos de colisión pueden clasificarse en respuestas balísticas del tipo todo-nada o respuestas controladas. En los sistemas controlados (recordar el caso de la abeja) el animal mide la entrada visual y modifica su

salida comportamental en forma gradual de acuerdo a la lectura que realiza de los cambios de la imagen.

Para comenzar a estudiar si *Chasmagnathus* regula su velocidad en función de algún parámetro de la imagen en expansión, interrumpimos las expansiones ( $S=70\text{cm}$ ,  $V=143\text{cm/s}$ ,  $L=10\text{m}$ ) a distintos tamaños angulares (ver figura 3.11). Los registros de velocidad muestran que los animales evalúan en forma continua el desarrollo de la expansión y actúan en consecuencia. En efecto, se observa que para todos los estímulos presentados, en cuanto la expansión finaliza, los animales desaceleran inmediatamente su carrera, lo que constituye una evidencia clara de que no se trata de una respuesta balística sino de una respuesta que se halla bajo un continuo control visual. En el capítulo siguiente analizaremos este punto con mayor detalle.



**Figura 3.11: Expansiones finalizadas a distintos tamaños angulares.** (Arriba) Velocidad promedio de un grupo de animales en función del tiempo. (Abajo) . Tamaño angular para los 5 estímulos aplicados. Los estímulos consisten en la misma dinámica de expansión, pero se corta la misma en  $\theta_{max}=23.2^\circ, 34.2^\circ, 44.6^\circ, 54.3^\circ, 62^\circ$ . Dinámica ( $R=35\text{cm}$ ,  $V=143\text{cm/s}$ ,  $L=10\text{m}$ ).  $N=5$  animales. Los 5 estímulos aplicados 2 veces por animal (orden de estimulación al azar).

## Capítulo 4

### Respuesta comportamental a distintas dinámicas de aproximación.

#### 4.1- Respuesta comportamental a distintas dinámicas de aproximación.

En el capítulo anterior describimos las características generales más importantes de la respuesta comportamental y encontramos parámetros óptimos para la estimulación como ser el intervalo entre ensayos, la dirección de aproximación y el contraste del objeto respecto al fondo.

En este capítulo, nos centraremos en hallar una variable que prediga cuando los animales deciden escapar. Para esto, es necesario utilizar distintas dinámicas de aproximación con el objetivo de encontrar algún parámetro del estímulo (por ejemplo el ángulo subtendido, la velocidad angular, la aceleración angular, el tiempo restante a la colisión, etc) que al alcanzar cierto valor umbral, evoque la respuesta de escape en todos los estímulos testeados.

En principio, existen infinitos tipos de trayectorias, velocidades y direcciones en que un predador puede acercarse a su presa, sin embargo en este estudio nos centraremos en las dinámicas y trayectorias de colisión más analizadas en la bibliografía que son aproximaciones a velocidad constante en línea recta hacia el observador.

En el capítulo 2 describimos los detalles de la simulación de estas aproximaciones. Se simulaban objetos de tamaño  $S$  que partían desde una distancia inicial  $L=10m$  y se acercaban a velocidad constante  $v$ .

Se utilizaron un total de 8 estímulos (ver tabla 4.1 y panel inferior de la fig. 4.1): En los estímulos 1 a 4 mantuvimos la velocidad de aproximación  $v=285$  cm/s y cambiamos el tamaño  $S$  del objeto (desde  $S=35$ cm hasta  $S=280$ cm). En los estímulos 5 a 8 mantuvimos  $S=70$  cm y variamos la velocidad  $v$  del objeto (desde  $v=71$ cm/s hasta  $v=572$ cm/s). Los estímulos 1 y 7 tuvieron el mismo tamaño y dinámica de expansión, por lo cual resultaban indistinguibles para el animal. La semejanza en los resultados obtenidos con estos estímulos sirven como un control interno dentro de cada serie experimental.

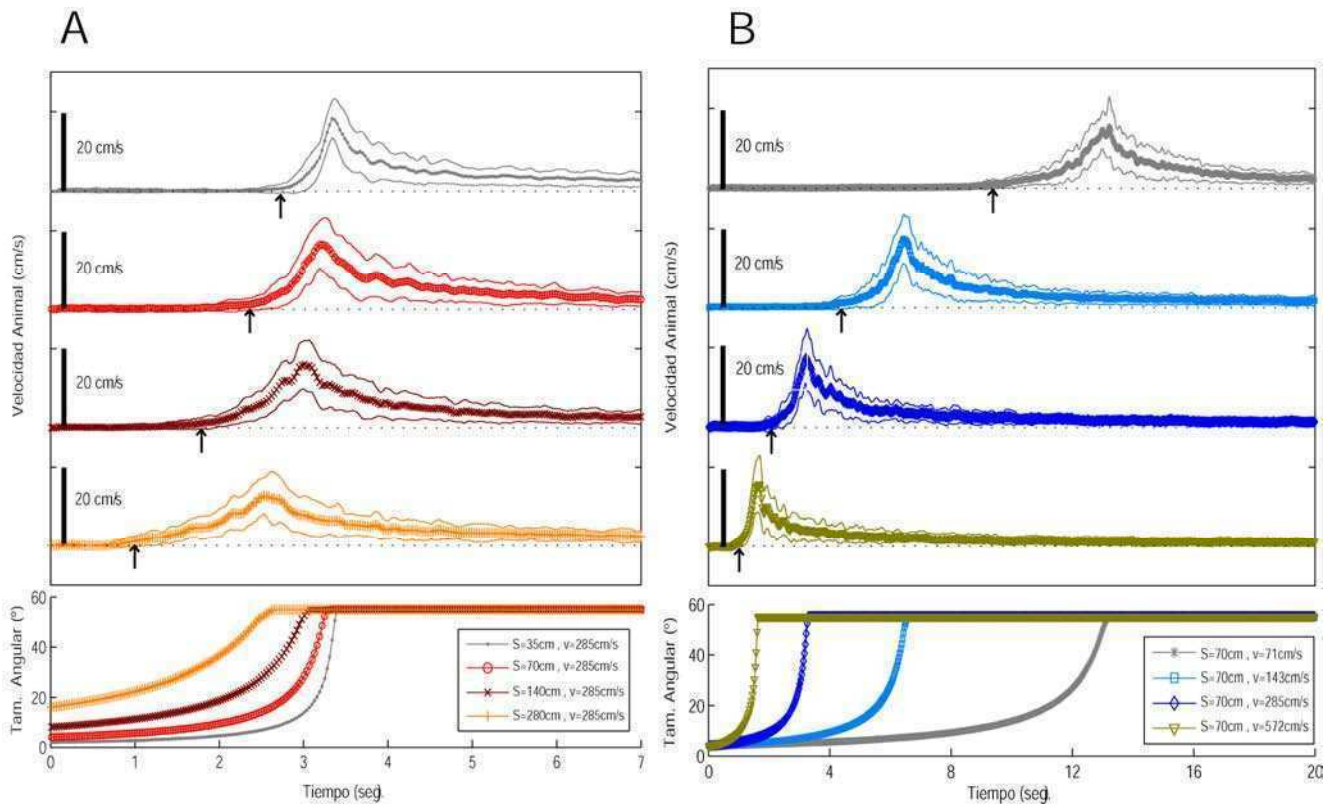
Número Estímulo	R(cm)	S(cm)	V cm/s	$\gamma=R/V$ (ms)	L (m)	T (s)	$\Theta_0$ (deg.)	Tamaño Inicial (cm).
1	17	35	285	60	10	3.5	1.94	0.68
2	35	70	285	120	10	3.5	4	1.40
3	70	140	285	250	10	3.5	8	2.81
4	140	280	285	490	10	3.5	15.9	5.62
5	35	70	71	490	10	14	4	1.40
6	35	70	143	250	10	7	4	1.40
7	35	70	285	120	10	3.5	4	1.40
8	35	70	572	60	10	1.74	4	1.40

**Tabla 4.1. Estímulos loomings simulados con aproximación a velocidad constante.** El parámetro S es el tamaño del objeto simulado que se aproxima,  $R=S/2$  (apotema), V es la velocidad de aproximación, L es la distancia desde donde parte el objeto, T es el tiempo de viaje entre la posición inicial hasta la colisión,  $\theta_0$  es el tamaño inicial del objeto en grados y el tamaño inicial en centímetros. El parámetro  $\gamma=R/v$  y es utilizado para describir la dinámica en función del tiempo a la colisión (ver capítulo 2 y figura 2.3). Notar que los estímulos 1 y 7 tienen exactamente la misma dinámica de expansión. Los estímulos fueron aplicados desde la derecha para maximizar la respuesta y reducir la variabilidad. La luminosidad de la figura fue  $4 \text{ mW/m}^2$  y del fondo  $240 \text{ mW/m}^2$ . El ITI fue de 3 minutos. El orden de aplicación de estímulos fue al azar.

#### 4.2- Curso temporal de la respuesta

En la figura 4.1.A, mostramos la velocidad promedio de los animales en función del tiempo para los estímulos 1 a 4 y en la figura 4.1.B para los estímulos 5 a 8 (ver tabla 4.1).

Como se ve, los animales están inicialmente quietos o moviéndose lentamente (fases Q o C) aun cuando el estímulo haya comenzado su expansión. El tiempo medio en que se produce el comienzo del escape se indica con flechas. Luego de esto, los animales incrementan su velocidad (fase E) hasta que la expansión finaliza. A partir de ahí su velocidad se reduce (fase D). De este modo puede apreciarse que las fases descriptas en el capítulo anterior vuelven a encontrarse para todas las dinámicas utilizadas.

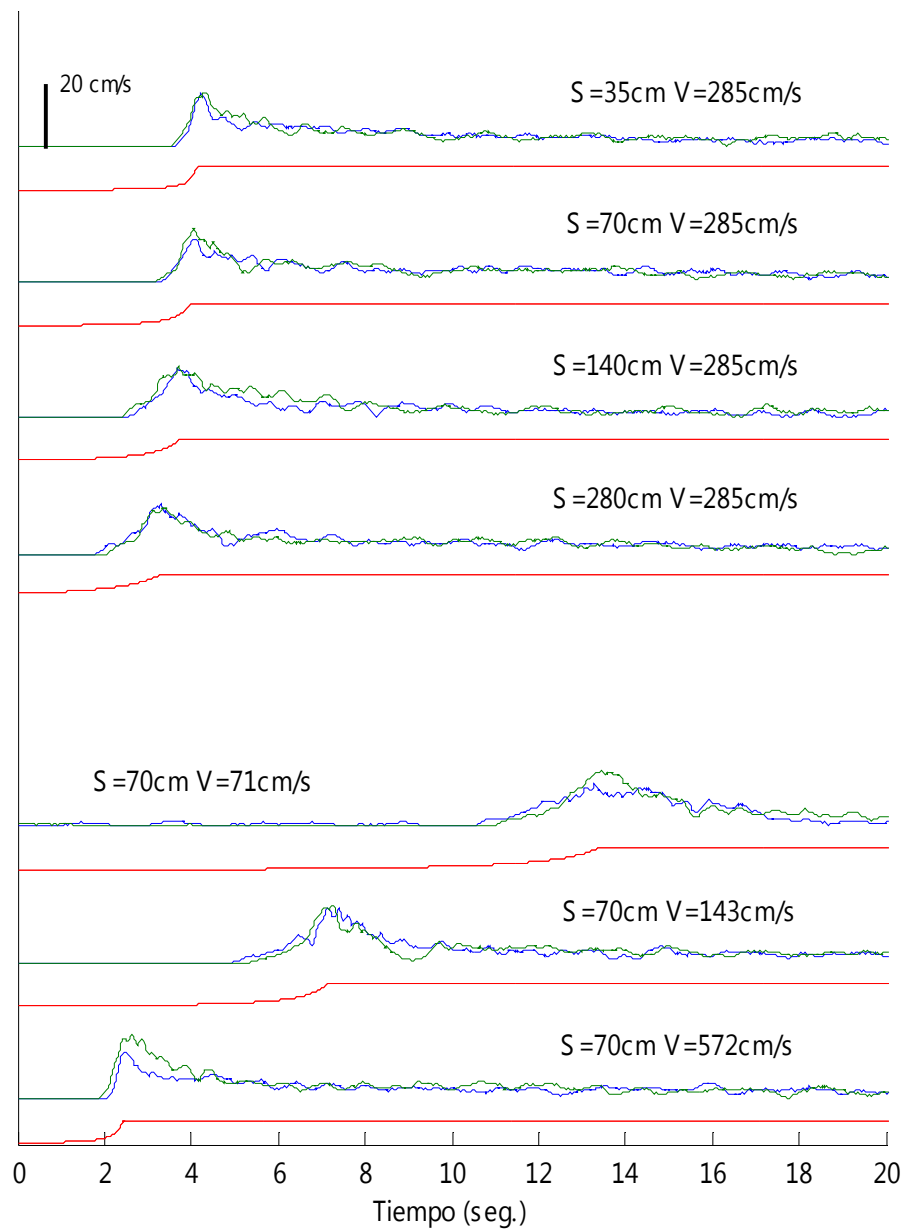


**Figura 4.1. Velocidad instantánea promedio de los animales para distintos estímulos de la tabla 4.1.** A) Respuestas y estímulos 1 a 4 (mantuvimos  $v=285$  cm/s y cambiamos el tamaño  $S$  del objeto). B) Respuestas y estímulos 5 a 8 (mantuvimos  $S=70$  cm y variamos la velocidad  $v$  del objeto).

En los paneles inferiores se muestra el tamaño angular  $\theta(t)$  para cada estímulo y en los superiores la velocidad media de los animales. Las líneas delgadas representan un desvío estándar de las mediciones. Numero de animales  $n=22$ . Los ocho estímulos fueron aplicados a cada animal en orden aleatorio. Se utilizó una ventana de filtrado cuadrado con ancho de 100 ms.

En la figura 4.2, mostramos la velocidad instantánea de un único animal en función del tiempo para los 7 estímulos diferentes. Para cada estímulo se muestran las respuestas a dos repeticiones realizadas en días distintos. En trazos rojos debajo de cada respuesta se muestra el tamaño angular de la expansión. Como se aprecia en la figura, las respuestas del animal es repetible, incluso en días distintos de aplicación.

Las trayectorias ante los 8 estímulos mostraron ser altamente direccionales como describimos en el capítulo anterior y la repetitibilidad en su curso temporal muestra que estamos en presencia de un comportamiento robusto y repetible.



**Figura 4.2. Velocidad instantánea de un animal para los distintos estímulos de la tabla 3b.2.1.** Con trazo rojo se muestra el tamaño angular  $\theta(t)$  para cada estímulo. Los trazos azules corresponden a las respuestas en el día 1 y los verdes a las respuestas en el día 2.

### 4.3 - ¿Qué variable óptica predice el comienzo del escape?

El objetivo de esta sección es encontrar una variable óptica que prediga cuando los animales deciden comenzar el escape. Para esto, es necesario utilizar distintas dinámicas de aproximación y encontrar algún parámetro del estímulo (por ejemplo el ángulo subtendido, la velocidad angular, la aceleración angular, el tiempo restante a la colisión, etc) que al alcanzar cierto valor umbral, evoque la respuesta de escape en todos los estímulos utilizados.

*Criterio para el comienzo del escape:* Para responder esta pregunta de esta sección, necesitamos establecer un criterio para definir el comienzo del escape. Como dijimos, antes del comienzo de la expansión, los animales pueden encontrarse caminando o quietos (en nuestros experimentos un 15% de los animales estaban en fase C y un 85% en la fase Q respectivamente).

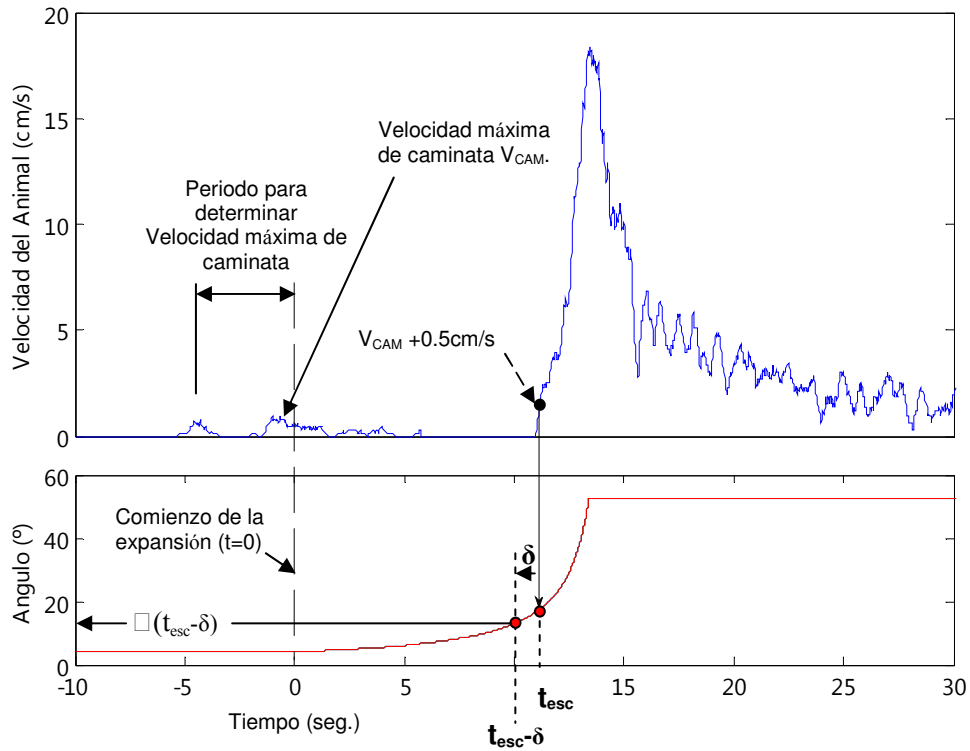
Para poder usar todos los animales evaluados, incluso aquellos que se hallaban caminando, definimos el comienzo del escape con un criterio conservador (ver figura 4.3). En este análisis asumimos que un animal comienza el escape cuando sobrepasa en 0.5 cm/s la *velocidad máxima de caminata* que tenía previo al comienzo de la expansión (definida como el valor máximo de velocidad instantánea a lo largo de un periodo de 5 segundos antes de comenzar el estímulo).

Para cada estímulo aplicado y cada animal, este criterio define un tiempo en el que se inicia el escape  $t_{esc}$ , que es el tiempo transcurrido entre el comienzo de la expansión ( $t = 0$ ) y el comienzo del escape.

Una vez determinado  $t_{esc}$ , lo utilizamos para buscar el valor de distintas variables del estímulo al momento del escape. Sin embargo hay un hecho importante que tendremos que considerar: existe un tiempo de retraso entre el momento en que el animal toma la decisión de escapar y el momento en que medimos su respuesta motora. Por lo tanto las variables que analicemos deben ser evaluadas en un tiempo  $t_{esc} - \delta$ , donde  $\delta$  es el retraso entre la toma de decisión de escapar y la respuesta motora asociada. Mas adelante mostraremos como se puede estimar matemáticamente, así como medir experimentalmente este valor (ver figura 4.3).

Ahora pasaremos a enumerar distintas variables  $Z(t)$  que el animal podría computar para decidir el comienzo del escape, algunas de las cuales mostraron tener importancia en trabajos comportamentales con distintas especies (ver sección 1.1.2).





**Figura 4.3. Representación grafica de la medición de la variable óptica cuando el animal decide comenzar el escape.** (Arriba) Velocidad de un animal para tiempos antes y después de la expansión. (Abajo): Con trazo rojo se muestra el tamaño angular  $\theta(t)$  de la expansión. La expansión comienza en  $t=0$ , en los 5 segundos previos medimos la velocidad máxima de caminata. Luego de comenzar la expansión buscamos el tiempo en el cual el animal sobrepasa en 0.5cm/s la velocidad máxima de caminata. Este es el tiempo que definimos como tiempo de inicio del escape ( $t_{esc}$ ). Luego de esto evaluamos distintas variables, en  $t_{esc}-\delta$ . En particular en esta figura mostramos gráficamente el proceso de evaluación del tamaño angular cuando el animal decide escapar  $\square(t_{esc}-\delta)$ . Es importante destacar que el valor de  $\delta$  dibujado en la figura está fuera de escala.

*Tiempo transcurrido desde el comienzo de la expansión:* Podría darse el caso de que el animal tenga un detector que señalice el comienzo de la expansión y decida comenzar el escape un tiempo fijo luego de esa detección. Este modelo predice que la variable interna  $Z_1(t_{esc} - \delta) = t_{esc} - \delta$  debería tener el mismo valor para las 8 dinámicas utilizadas.

*Tiempo restante a la colisión:* Algunos animales (por ejemplo las palomas) tienen neuronas que disparan fuertemente un tiempo fijo antes de producirse la colisión (ver sección 1.2.3). Por lo tanto mediremos el valor del tiempo a la colisión  $t_c$ ,  $\delta$  milisegundos antes de comenzar el escape. Denominaremos esta variable:  $Z_2(t_{esc} - \delta) = t_c(t_{esc} - \delta) = \sin(\theta(t_c - \delta)) / \dot{\theta}(t_c - \delta)$  (ver sección 2.3.3).

*Tamaño angular, Velocidad angular o Aceleración angular:* Existen animales que producen respuestas de protección cuando el tamaño angular tiene un valor fijo (por ejemplo la langosta (Fotowat y Gabbiani 2007)). Otra posibilidad podría ser la velocidad angular (Hemmi et.al 2005) o la aceleración angular. Por lo tanto evaluaremos el tamaño angular  $Z_3(t_{esc} - \delta) = \theta(t_{esc} - \delta)$ , la velocidad angular,  $Z_4(t_{esc} - \delta) = \dot{\theta}(t_{esc} - \delta)$  y la aceleración angular  $Z_5(t_{esc} - \delta) = \ddot{\theta}(t_{esc} - \delta)$ .

*Incremento angular:* El último criterio analizado fue el incremento angular que denominaremos  $Z_6(t_{esc} - \delta) = \Delta\theta(t_{esc} - \delta) = \theta(t_{esc} - \delta) - \theta(t = 0)$ . Como vimos en la sección 1.1.2, el crayfish hace el despliegue de levantamiento de quelas cuando el tamaño angular del objeto que se aproxima se incrementa en un valor de 8 grados.

#### 4.4 – Estimación del tiempo de retraso entre una toma de decisión y la salida motora.

Una vez definidas las variables que vamos a analizar, queremos saber si alguna de ellas tiene el mismo valor cuando el animal decide comenzar el escape para todos los estímulos, es decir, buscamos encontrar que, con independencia de cada estímulo, la decisión de iniciar el escape está ligada a un valor común y fijo de alguna de las variables. Para este análisis, debemos conocer con detalle el retraso  $\delta$  entre la toma de decisión de escapar y la respuesta motora asociada. La necesidad de establecer fehacientemente este valor radica en que la sustracción de  $\delta$  afecta de manera muy sensible a los valores de las variables  $Z$  en los estímulos de expansión rápidos. Empezaremos realizando un análisis introducido en el estudio de la respuesta de salto de la langosta por Fotowat y Gabbiani (2007).

En este análisis, se parte de un retraso  $\delta$  desconocido que pasa a ser un parámetro a determinar. El retraso se obtiene de pedir que el umbral de la variable  $Z(t_{esc} - \delta)$  valga lo mismo para todos los estímulos aplicados. Si se cumple esto, una condición necesaria que debe cumplir  $\delta$ , es que el valor de  $Z(t_{esc} - \delta)$  en el escape, esté descorrelacionada con un índice que describe unívocamente los estímulos aplicados.

¿Pero cual es el índice que describe unívocamente los estímulos?, Gabbiani parte de la siguiente ecuación para la expansión angular (ver sección 2.3.1)

$$\tan(\theta/2) = \frac{R}{x(t)} = \frac{R}{v \cdot t_c} = \frac{R/v}{t_c}, \text{ donde } t_c \text{ es el tiempo a la colisión.}$$

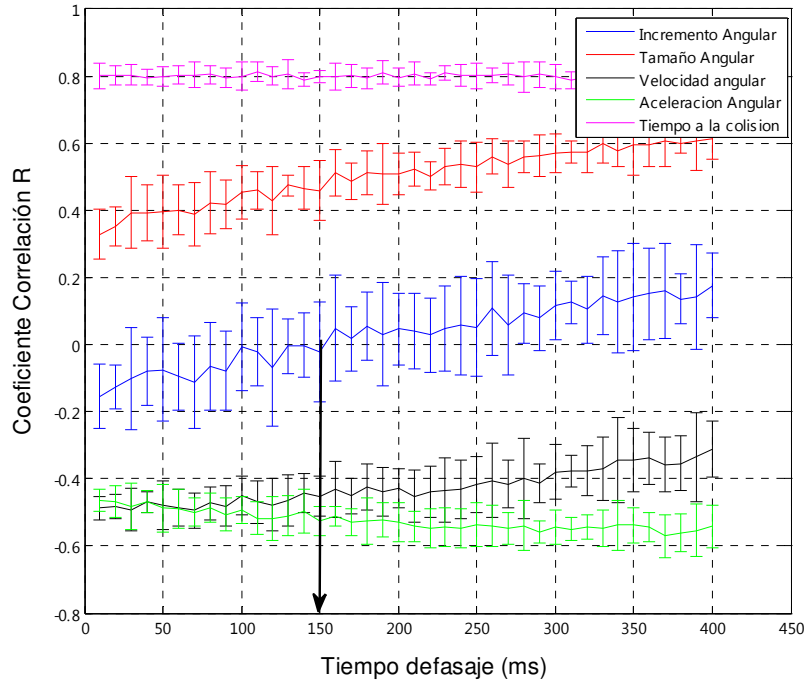
Por lo tanto, el parámetro que describe el estímulo de expansión es el cociente  $R/v$ . Fotowat y Gabbiani (2007) calculan los coeficientes de correlación entre  $R/v$  y  $Z(t_{esc} - \delta)$  para distintos valores de  $\delta$ . Las variables  $Z$  utilizadas en este trabajo fueron el tamaño, la velocidad, la aceleración angular y el tiempo a la colisión.

Una vez que encontraron los valores de  $\delta$  para los cuales las variables  $Z$  estaban descorrelacionadas con el parámetro  $R/v$ , hicieron un test de Kruskal Wallis para analizar si existen diferencias significativas, ya que podría darse el caso de obtener un coeficiente de correlación nulo pero igualmente existir diferencias significativas entre los valores de  $Z(t_{esc} - \delta)$  para los distintos estímulos.

De este modo, nos propusimos realizar este análisis, con la única diferencia de que tenemos dos parámetros para describir unívocamente los estímulos. En nuestros estímulos variamos tanto la velocidad de aproximación  $v$ , como el tamaño del objeto  $S$ . Por lo tanto, una condición necesaria correcta en nuestro caso es pedir que la correlación entre  $R/v$  y  $Z(t_{esc} - \delta)$  se anule y además se anule la correlación entre  $\theta_0$  y  $Z(t_{esc} - \delta)$ . Donde  $\theta_0$  es el tamaño angular inicial del estímulo. Consideramos que esta condición debería haber sido testeada en el trabajo en la langosta, pero en ese trabajo no es tan importante porque los estímulos que utilizaron partían de tamaños angulares muy pequeños.

En la figura 4.4, mostramos los coeficientes de correlación entre  $R/v$  y las siguientes variables  $\delta$  ms antes del escape : el tiempo a la colisión  $t_{esc} - \delta$ , el tamaño angular  $\theta(t_{esc} - \delta)$ , la velocidad angular  $\dot{\theta}(t_{esc} - \delta)$ , la aceleración angular  $\ddot{\theta}(t_{esc} - \delta)$  y la variación (o incremento) angular  $\Delta\theta(t_{esc} - \delta) = \theta(t_{esc} - \delta) - \theta(t = 0)$ .

Como se ve en la figura, todas las variables ópticas salvo  $\Delta\theta(t_{esc} - \delta)$  están correlacionadas con  $R/v$  para un rango de valores de  $\delta$  entre 0 y 400 ms. La variable  $\Delta\theta(t_{esc} - \delta)$ , sin embargo, anula su correlación con  $R/v$  alrededor de  $\delta = 150$  ms que será nuestra primera estimación de defasaje entre la toma de decisión y la respuesta motora.



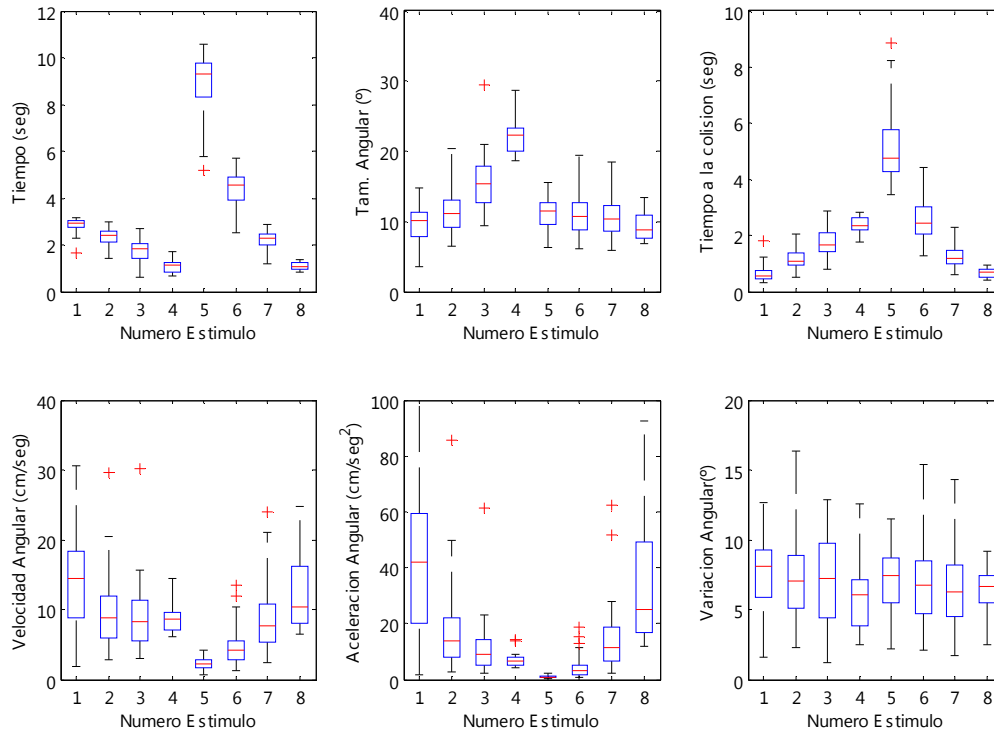
**Figura 4.4.** Coeficientes de correlación entre R/V y distintas variables ópticas analizadas en la bibliografía  $\delta$  ms antes de que el animal decide escapar (según Fotowat y Gabbiani 2007). Se midieron las correlaciones con: El tamaño angular, el tiempo restante para la colisión, la velocidad angular, la aceleración angular y el incremento angular. Número de animales  $n=22$ . Los ocho estímulos fueron aplicados a cada animal en orden aleatorio.

Pero como dijimos, en nuestro análisis pedimos otra condición necesaria que debe cumplir la variable óptica  $\Delta\theta(t_{esc} - \delta)$  si esta determina el escape: debe anularse la correlación entre el índice  $\theta_0$  y  $\Delta\theta(t_{esc} - \delta)$ . Cuando medimos este coeficiente de correlación, obtuvimos el valor de  $\rho = -0.15 \pm 0.17$  (los intervalos de confianza para el coeficiente de correlación son del 95% estimados según la técnica de bootstrap) (Wasserman 2004). Por lo tanto, no podemos rechazar la hipótesis de que la correlación sea nula ( $\rho = 0$ ).

Siguiendo el método de Gabbiani ahora comparamos cada variable óptica (a  $\delta=150ms$ ), con un test de Kruskal Wallis para evaluar que no existan diferencias significativas entre los valores para los distintos estímulos.

En la figura 4.5 mostramos la distribución de las distintas variables ópticas 150 ms antes de que el animal decida comenzar el escape. De la información de estos gráficos y el análisis anterior se puede concluir que: *De las variables analizadas, la única cuyo valor permanece constante para todos los estímulos es el incremento angular*. En efecto, esta es la única variable de las evaluadas que presenta un mismo valor cualquiera sea el estímulo 150ms antes del comienzo del escape ( $p=0.40$ ). Como era de esperar de la primera parte del análisis, las otras variables no cumplen este

criterio presentando diferencias significativas en sus valores para los distintos estímulos ( $P < 0.0001$ ). Por lo tanto llegamos a la conclusión que en los estímulos aplicados a los animales, el escape comienza cuando  $\Delta\theta(t - \delta) = \theta(t - \delta) - \theta(t = 0)$  sobrepasa un valor de aproximadamente  $7 \pm 0.3$  grados.



**Figura 4.5.** Valores de distintas variables ópticas cuando el cangrejo decide comenzar a escapar. Las líneas rojas representan las medianas, los cuadrados son los cuartiles inferior y superior. Las barras punteadas representan la extensión del resto de los datos. A) Tiempo en que se produce el escape. B) Tamaño angular. C) Tiempo restante para la colisión. D) Velocidad angular. E) Aceleración angular. F) Variación Angular. Número de animales  $n = 22$ . Los ocho estímulos fueron aplicados a cada animal en orden aleatorio. (a\_p2\_220409\_umbral\_vlv\_boot0c.m)

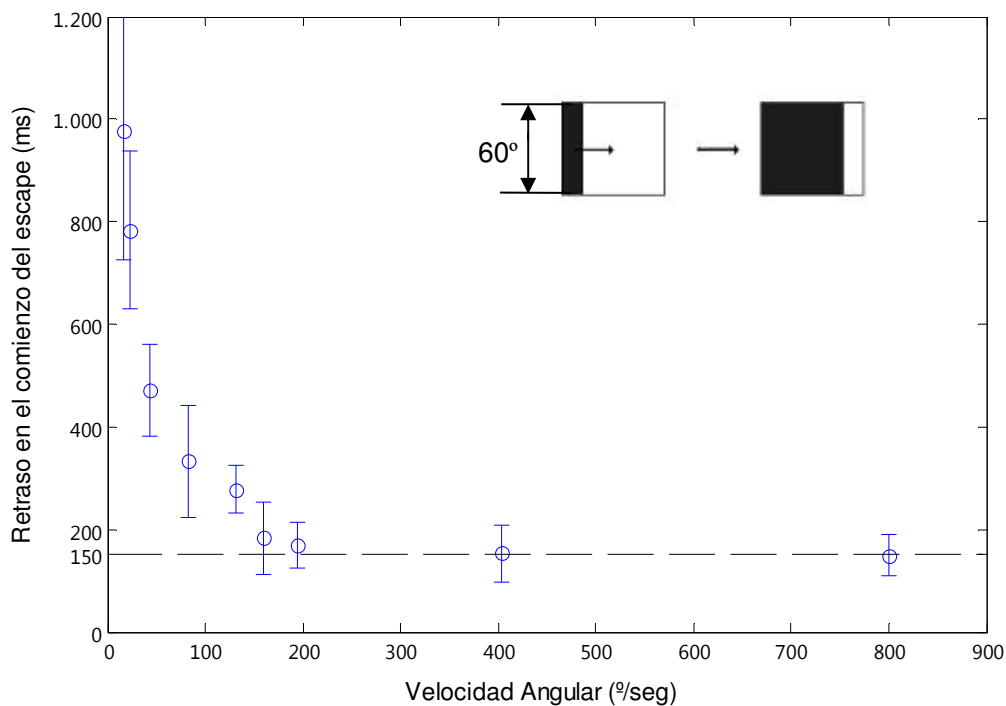
#### 4.5— Medición del tiempo de retraso entre la toma de decisión y la ejecución del escape.

El análisis de la sección anterior supone que el animal comienza a decidir iniciar el escape cuando una variable óptica del estímulo sobrepasa un valor umbral. Esta decisión se hace comportamentalmente medible con un retraso  $\delta \approx 150ms$ . Es importante destacar que el análisis parte de la suposición de que existe una variable óptica que permanecerá constante para todos los estímulos y de la búsqueda de esa constante se deduce el valor del desfase estimado.

El método entonces, constituye mucho mas una estimación que una medición cierta del retraso entre la decisión y la ejecución de la respuesta. Pero como explicamos antes, el valor del retraso  $\delta$  es crucial para la búsqueda de la variable que contenga un valor común a todos los estímulos al momento que el animal decide el escape. Por lo tanto decidimos realizar una medición experimental directa del desfasaje decisión - ejecución.

Para esto medimos la latencia de la respuesta de los animales frente a una serie de estímulos que de manera inminente representan una amenaza para el animal. Tales estímulos consistieron en un frente negro de gran altura ( $60^\circ$ ) con movimiento tangencial (ver inset de la figura 4.6). A diferencia de un cuadrado en expansión que parte de un tamaño pequeño (del orden de los  $10^\circ$ ), si el frente se mueve suficientemente rápido, el animal lo interpretará como un peligro de manera inmediata y tomará la decisión de escapar instantáneamente. De este modo, la latencia en la respuesta de escape estará dada solo por el retraso entre la toma de decisión y el movimiento del sistema motor.

En la figura 4.6, mostramos la latencia para el comienzo del escape, en función de la velocidad angular del movimiento del estímulo tangencial.



**Figura 4.6: Estimación del desfasaje entre la entrada visual y la salida motora.** El dibujo arriba a la derecha, representa el estímulo utilizado. Este es un frente negro que avanza sobre un fondo blanco con velocidad angular constante. El gráfico muestra la reducción de la latencia entre el comienzo del movimiento del frente y la respuesta de escape. La latencia disminuye a medida que aumenta la velocidad de desplazamiento del frente hasta llegar a un mínimo de 150ms. Interpretamos que este comportamiento asintótico en el retraso (para velocidades mayores a 200%/s) corresponde al tiempo empleado en el viaje de las señales hasta el sistema motor su activación y transformación en movimiento de la esfera. Todos los estímulos fueron aplicados a cada animal (N=10 animales).

Podemos apreciar que la demora es de 1 segundo aproximadamente para velocidades angulares bajas (20°/s) y que se reduce gradualmente hasta un mínimo de 150 ms para velocidades angulares de 200 °/s. De este experimento concluimos que el retraso de la señal entre la entrada visual y la medición comportamental del comienzo del escape es efectivamente  $\delta \approx 150ms$ . Es decir, que las conclusiones que predice el escape con un  $\Delta\theta$  de aproximadamente 7 grados son correctas.

#### 4.6 - ¿Que variable predice el freezing de los animales que se encontraban caminando antes de comenzar la expansión?

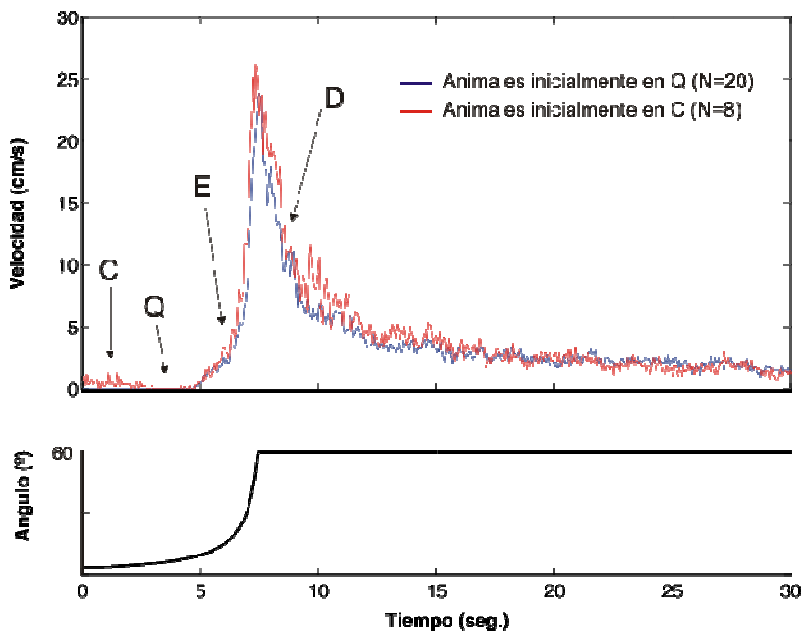
Como discutimos en la sección 1.1.3, los estudios etológicos con el cangrejo *Uca* muestran que frente a un objeto que se acerca, una estrategia previa al escape, consiste en detenerse (freezing) (ver figura 1.6). Coincidentemente, nuestros experimentos de la sección 3.1.1 mostraron que la respuesta de *Chasmagnathus* a los estímulos de expansión en el laboratorio también está compuesta por distintas fases (ver figura 3.1). Si los animales se encuentran caminando antes del comienzo de la expansión (estado C), se observa que estos animales se detienen y se quedan quietos (estado Q) durante un tiempo, para luego comenzar la respuesta de escape (estado E). En la figura 4.7 se grafican las velocidades medias de un grupo de animales separando los registros en dos grupos: los animales que se encontraban quietos a  $t=0$  y los que se encontraban caminando. Interpretamos que esta respuesta de freezing o inmovilidad se debe a una o a ambas de las siguientes dos razones: a) el animal utiliza esta estrategia para camuflarse, b) estabiliza la imagen visual para adquirir mejor información para decidir en que dirección escapar y con que velocidad. Además es posible que si el animal se encuentra caminando deba reajustar todo su patrón motor para escapar en la dirección contraria a la expansión.

La pregunta que surge es ¿Que variable predice el momento en que los animales que se encontraban caminando, deciden detenerse? En la figura 4.8, mostramos el tiempo  $t_{stop}$  y el incremento angular  $\Delta\theta(t_{stop} - \delta)$  150ms antes de que se produzca el freezing. El análisis estadístico de los incrementos angulares muestra que no hay diferencias significativas ( $p=0.25$ , test de Kruskal Wallis,  $N=7$ ). Por lo tanto concluimos que el incremento angular es una variable aceptable para dar cuenta de la transición (C->Q).

Una observación interesante es que la respuesta de freezing se dispara cuando el estímulo se incrementa en un valor de apenas 1.5°, que es aproximadamente el tamaño del ángulo interommatidial en el ecuador del ojo ( $\Delta\rho=1^\circ$  aproximadamente).

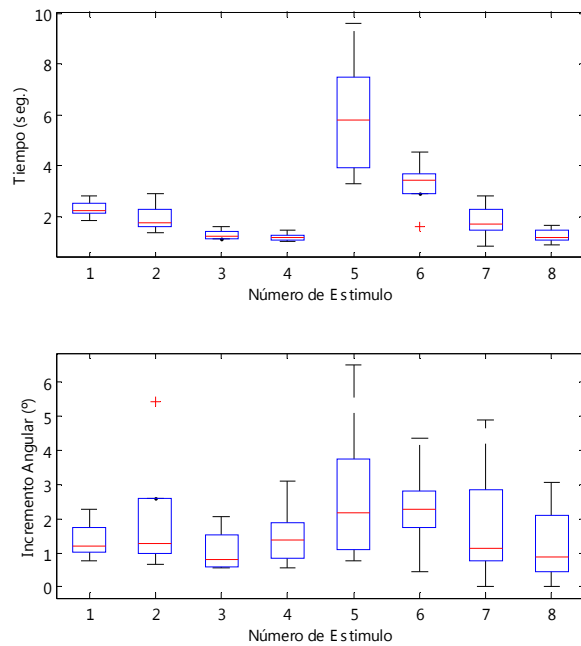
Luego de analizar el freezing de los animales que estaban inicialmente caminando, nos preguntamos si estos animales diferían en el comienzo del escape respecto a los animales que estaban inicialmente quietos. Para responder esto separamos nuevamente a los animales en dos grupos (animales que se encontraban caminando y animales que estaban quietos al comenzar la expansión) y analizamos si existían diferencias significativas entre estos dos grupos para los 8 estímulos testeados. Las comparaciones entre los dos grupos dieron no significativas ( $p>0.20$ ) para todos los estímulos.

Finalmente, en la figura 4.9 resumimos los resultados obtenidos sobre el freezing y el comienzo del escape.

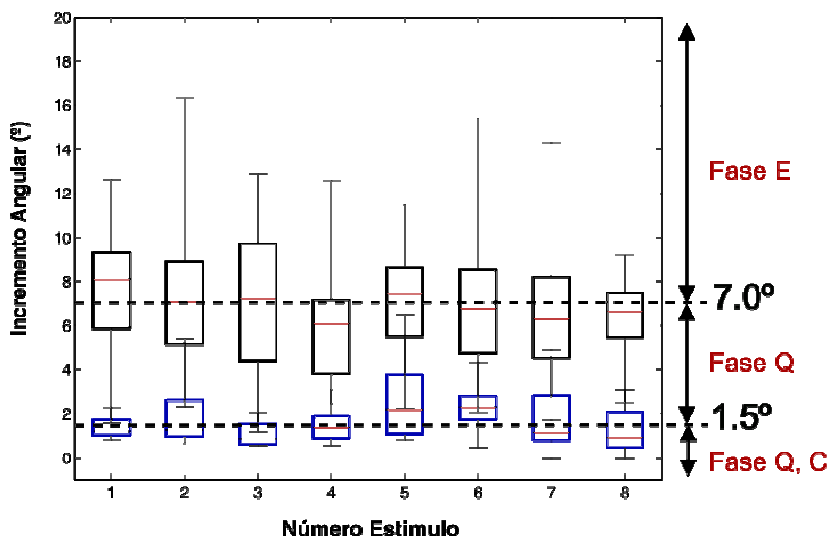


**Figura 4.7:** Velocidades medias de los animales que estaban quietos a  $t=0$  (trazo azul,  $n=20$  animales) y los que se encontraban caminando (trazo rojo,  $n=8$  animales). Se ve claramente como estos últimos se detuvieron durante la fase Q y luego desarrollaron una respuesta de escape similar a los animales que estaban inicialmente quietos.





**Figura 4.8: Tiempos e incrementos angulares correspondientes al inicio del freezing (transición C->Q) para los 8 estímulos looming.** (Arriba) Tiempo en que se produce la transición C->Q para los animales que se encontraban caminando al comenzar la expansión. (Abajo) Incremento angular 150 ms antes de producirse la transición. (N=7 animales).



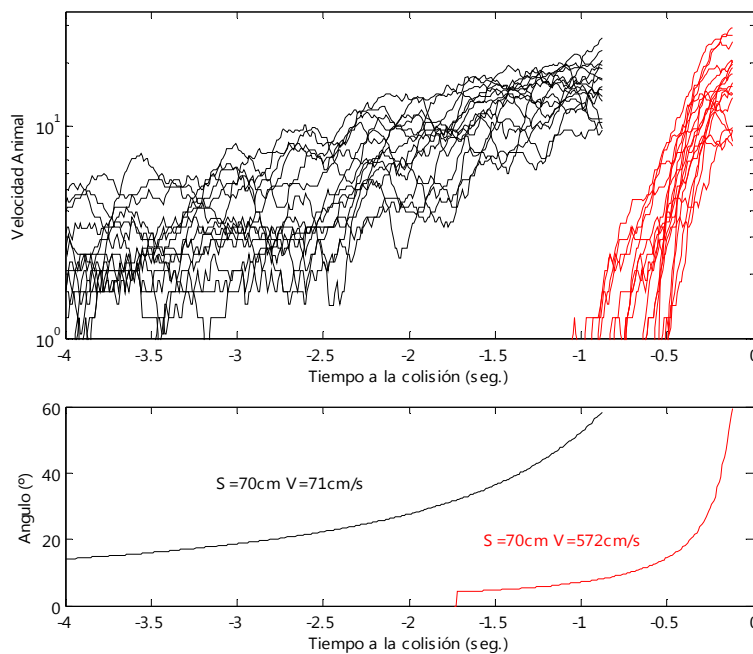
**Figura 4.9: Incremento angular correspondiente al comienzo de la inmovilidad y al comienzo del escape en los 8 estímulos aplicados.** Los animales que se encuentran inicialmente caminando (Fase C), se detienen en promedio cuando el estímulo se incrementó en 1.5° (n=7 animales). Luego de esto, se mantienen quietos (Fase Q) y el escape (Fase E) comienza en promedio cuando el estímulos se incrementan en 7° (n=20 animales).

#### 4.7- Regulación de la velocidad del escape.

La casi totalidad de los modelos experimentales animales donde se estudia el procesamiento visual y las respuestas a estímulos de colisión, se limitan a investigar el momento de la detección e inicio de la respuesta conductual. En otras palabras, se trata de modelos experimentales donde las respuestas comportamentales a los estímulos loomings son de tipo balísticas. Así, una vez comenzado el escape, el cangrejo podría lanzarse a correr a su máxima velocidad (Land y Layne 1995). Sin embargo, este parece no ser el caso para *Chasmagnathus*. En la figura 3.11 vimos que los animales interrumpen su carrera inmediatamente luego de que el estímulo deja de expandirse, y que esto lo hacen independientemente de la velocidad a la que venían corriendo. En la figura 4.1 podemos apreciar que los animales aumentan gradualmente su velocidad en una aparente relación con la dinámica de expansión de la imagen.

En la figura 4.10 mostramos que las curvas de crecimiento de velocidad de los animales para dos dinámicas de aproximación extremas (una lenta con  $R/v=490$  ms y otra rápida  $R/v=60$  ms) son muy distintas (ver apéndice 4.A para un análisis estadístico de este hecho).

En conjunto, estos resultados anulan la posibilidad de que el animal este respondiendo con un modo de escape a máxima velocidad (tipo todo o nada) cuando decide escapar.



**Figura 4.10: Respuestas individuales de escape de *Chasmagnathus* en función del tiempo a la colisión.** En esta figura mostramos respuestas individuales para una dinámica de expansión rápida ( $R/v=60$ ms, trazo rojo) y otra lenta ( $R/v=490$ ms, trazo negro). Como se puede apreciar las curvas de crecimiento de velocidad durante el escape difieren significativamente entre ambos estímulos, lo que sugiere que los animales regulan su velocidad en función del estímulo visual ( $n=17$  animales, los 2 estímulos fueron aplicados a cada animal).

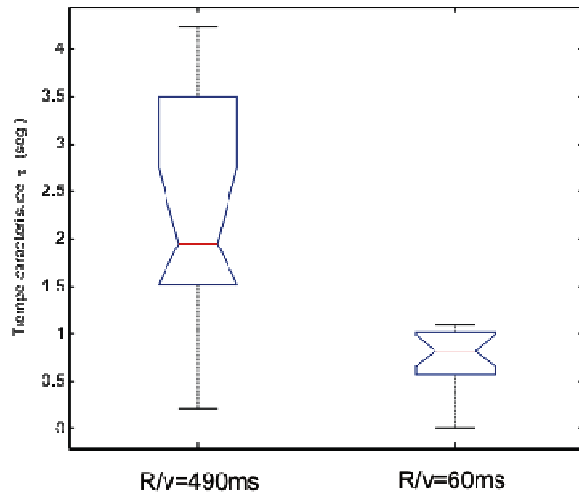
## Apéndice 4.A – Regulación de velocidad en registros individuales.

Para cuantificar estadísticamente las diferencias en las respuestas de la figura 4.10 para las dinámicas  $R/v=490$  ms y  $R/v=60$  ms, graficamos la velocidad de registros individuales en escala logarítmica. Como se ve, el crecimiento de velocidad para los registros individuales puede ser aproximado por un crecimiento exponencial, ya que, en escala logarítmica el crecimiento de velocidad puede aproximarse por una función lineal:

$$v(t_c) = A \cdot e^{t_c / \tau} \quad \text{ec. 4.1}$$

$$\log(v(t_c)) = \log(A) + t_c / \tau$$

Ajustando por cuadrados mínimos rectas a los registros individuales de velocidad en la figura 4.10, podemos obtener la distribución de los tiempos característicos asociados al crecimiento de velocidad. En la figura 4.11 mostramos la distribución de valores de  $\tau$  para los estímulos con  $R/v=490$  ms y  $R/v=60$  ms.



**Figura 4.11: Distribución de tiempos característicos de crecimiento para registros individuales.** Los valores obtenidos para los tiempos característicos fueron (medias y desvíos estándar):  $\tau(R/v=60\text{ms})=0.81\pm0.45$  seg y  $\tau(R/v=490\text{ms})=2.31\pm1.25$  seg. Ambos valores presentan diferencias significativas  $p=0.00005$ . Las líneas rojas representan las medianas, también representamos los cuartiles inferior y superior. Las barras punteadas representan la extensión del resto de los datos ( $n=22$ ).

De los resultados presentados en las figuras 4.10 y 4.11 podemos concluir que *Chasmagnathus* regula su velocidad durante el escape.

*Aclaración respecto a los datos utilizados en los ajustes según la ec. 4.1:*

Debemos aclarar que estamos modelando el comportamiento del animal una vez que comenzó el escape y en este análisis utilizaremos los registros comportamentales cuando velocidad media es mayor a 3cm/s. Utilizamos este criterio porque para velocidades menores a este valor, la distribución de velocidades es bimodal, esto se debe a que tenemos animales quietos (velocidad=0) y animales que ya comenzaron el escape. Para resolver este problema, verificamos que cuando las velocidades medias son mayores a 3cm/s la distribución de las velocidades es unimodal y correctamente aproximada por una distribución gaussiana (test de Lilliefors). Por lo tanto en este rango de velocidades es válido el ajuste usando la ecuación 4.1.

## Capítulo 5

### Codificación neuronal de las neuronas LG de los estímulos de colisión

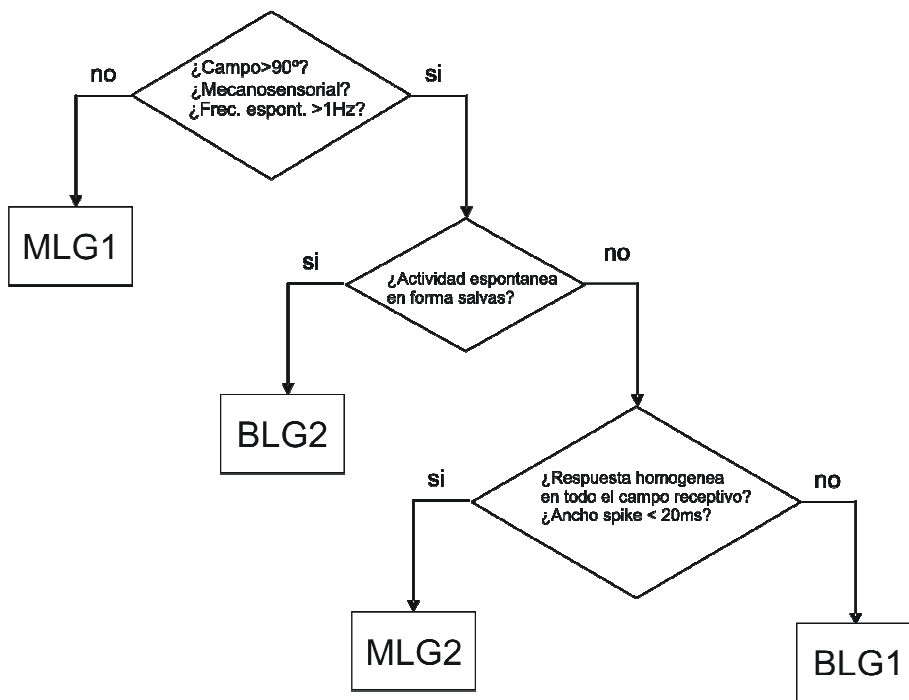
#### 5.1- Antecedentes

Como discutimos en el capítulo 1, el cangrejo *Chasmagnathus* es un modelo adecuado para estudios neurofisiológicos de la visión, en particular del procesamiento de información de movimiento y su relación con el comportamiento (Tomsic et al. 2003). En trabajos previos realizados en nuestro grupo (Berón de Astrada et al., 2001; Berón de Astrada & Tomsic, 2002), se mostró que las neuronas detectoras de movimiento NDM de la lóbula presentan las siguientes características: 1) mayor sensibilidad por el movimiento que por cambios estacionarios en la iluminación; 2) una disminución de respuesta frente a la estimulación reiterada que refleja la disminución de la respuesta de escape; 3) en algunos casos, sensibilidad a estímulos mecánicos aplicados en distintas parte del cuerpo del animal; 4) cierta preferencia por la dirección de movimiento. Originalmente llamaron al conjunto de estos elementos Neuronas Detectoras de Movimiento (NDM) y actualmente son denominadas Neuronas Gigantes de la Lóbula (LG).

Recientemente, hemos caracterizado detalladamente las propiedades morfológicas y electrofisiológicas de 4 tipos de neuronas LG denominadas: Neuronas Gigantes de la Lóbula Monoestratificadas 1 y 2 y Neuronas Gigantes de la Lóbula Biestratificadas 1 y 2. Estas neuronas se denominan (de su nombre en ingles) MLG1, MLG2, BLG1 y BLG2 respectivamente (Medan et.al 2007). A partir de este trabajo, que se fue desarrollando en paralelo a mi trabajo de doctorado y en el que colaboré, mostramos que las neuronas gigantes de la lóbula son detectoras de objetos y que su actividad a un patrón optomotor es reducida. Esto sugiere que estas neuronas estarían involucradas en comportamientos de interacción con objetos más que con la detección del flujo óptico de campo amplio (ver tabla 1.1). Una consecuencia práctica importante de este trabajo es que, habiendo identificado una serie de características electrofisiológicas propias de cada uno de los grupos morfológicamente identificados, ahora podemos predecir con un alto grado de fiabilidad el tipo de neurona que estamos registrando sin necesidad de teñirlas intracelularmente.

### 5.1.1- Criterio para la clasificación de las neuronas LG

Para determinar la identidad de cada una de las neuronas registradas se utilizaron propiedades como el tamaño del campo receptivo, su actividad de espontánea, su respuesta a estímulos mecanosensoriales y su respuesta a un pulso de luz, (Medan et. al 2007). Estas propiedades se resumen en la tabla 1.2.2 y el criterio para clasificar las neuronas a partir de sus registros electrofisiológicos se muestra en la figura 5.1.



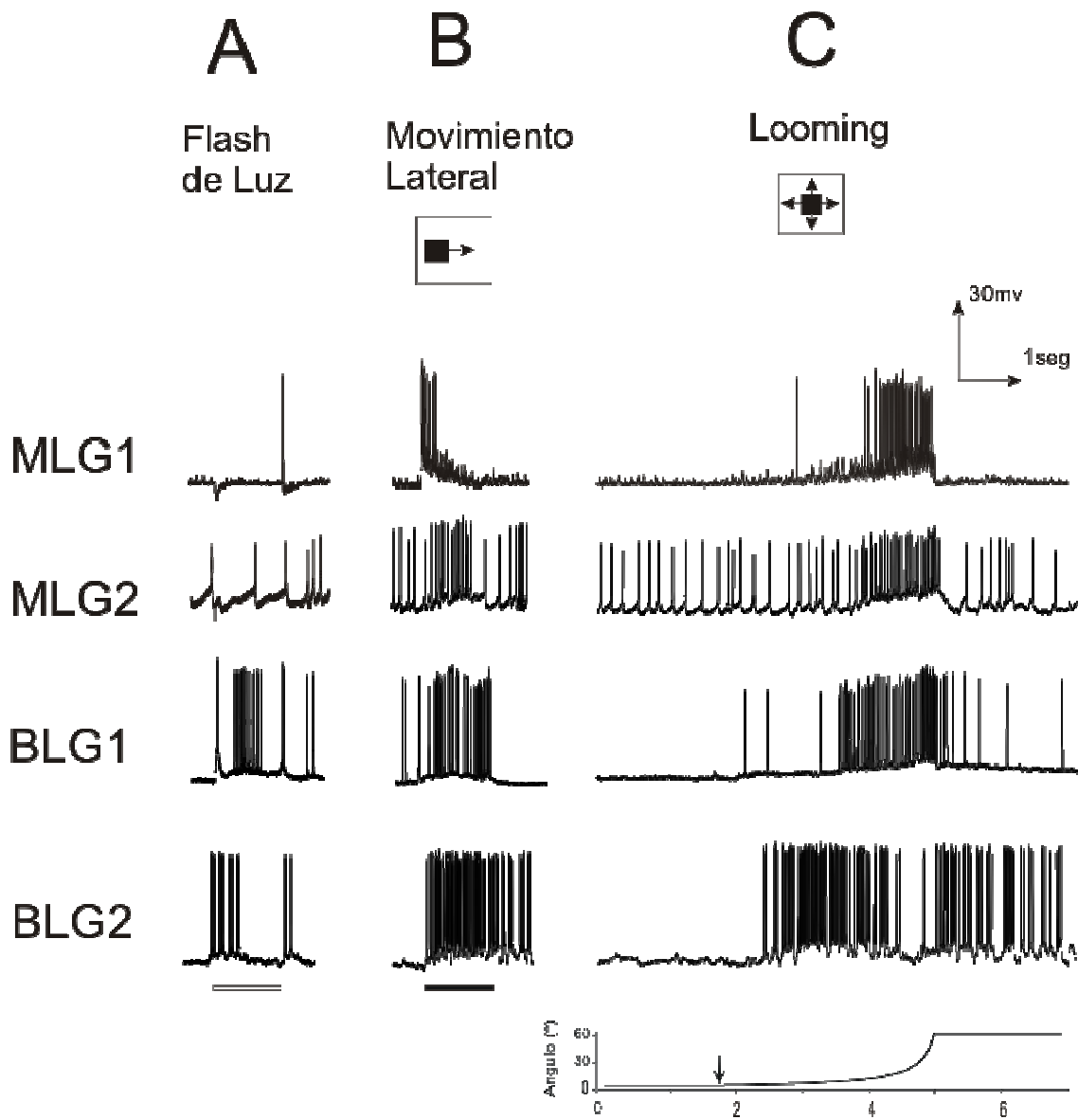
**Figura 5.1- Criterio de clasificación de las neuronas LG en los tipos MLG1, MLG2, BLG1, BLG2.**

A partir de esta clasificación estudiamos la actividad de las neuronas LG a los estímulos de colisión en cada uno de los grupos por separado. En la sección 5.2, hacemos una primera caracterización de la respuesta a un conjunto de estímulos visuales para analizar las propiedades de la imagen que moldean la respuesta de las LG (Oliva et. al 2007). Luego en la sección 5.3 pasaremos a describir de la respuesta de estas neuronas ante distintas dinámicas de aproximación.

## **5.2- Respuesta de las LG a distintos estímulos visuales**

### **5.2.1 – Las neuronas gigantes de la lóbula responden preferencialmente a estímulos en movimiento.**

Como fue mostrado con anterioridad en nuestro grupo, las neuronas gigantes de la lóbula responden preferencialmente a objetos en movimiento. En esos estudios se utilizó como estímulo visual de movimiento una pantalla que rotaba sobre el animal (Berón de Astrada et. al. 2001, Tomsic et. al. 2003). En los trabajos de Oliva et.al. (2007) y Medan et.al (2007) estimulamos visualmente a las LG utilizando el dispositivo descrito en la sección 2.4. Este nuevo dispositivo, nos permitió generar una gran variedad de estímulos visuales y así caracterizar con mayor detalle la actividad de estas neuronas. En la figura 5.2 mostramos las respuestas típicas de las neuronas MLG1, MLG2, BLG1 y BGL2 a un pulso de luz, a un cuadrado con movimiento lateral y a un estímulo cuadrado en expansión (estímulo looming). Como se ve, la respuesta de estas neuronas a un pulso de luz es menor que a los objetos que se mueven. También se puede apreciar que los estímulos de colisión generan respuestas particularmente intensas. Las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1 aumentan su tasa de disparo a medida que se produce la expansión. En cambio, las neuronas BLG2 responden intensamente para tamaños angulares pequeños y luego disminuyen su respuesta.



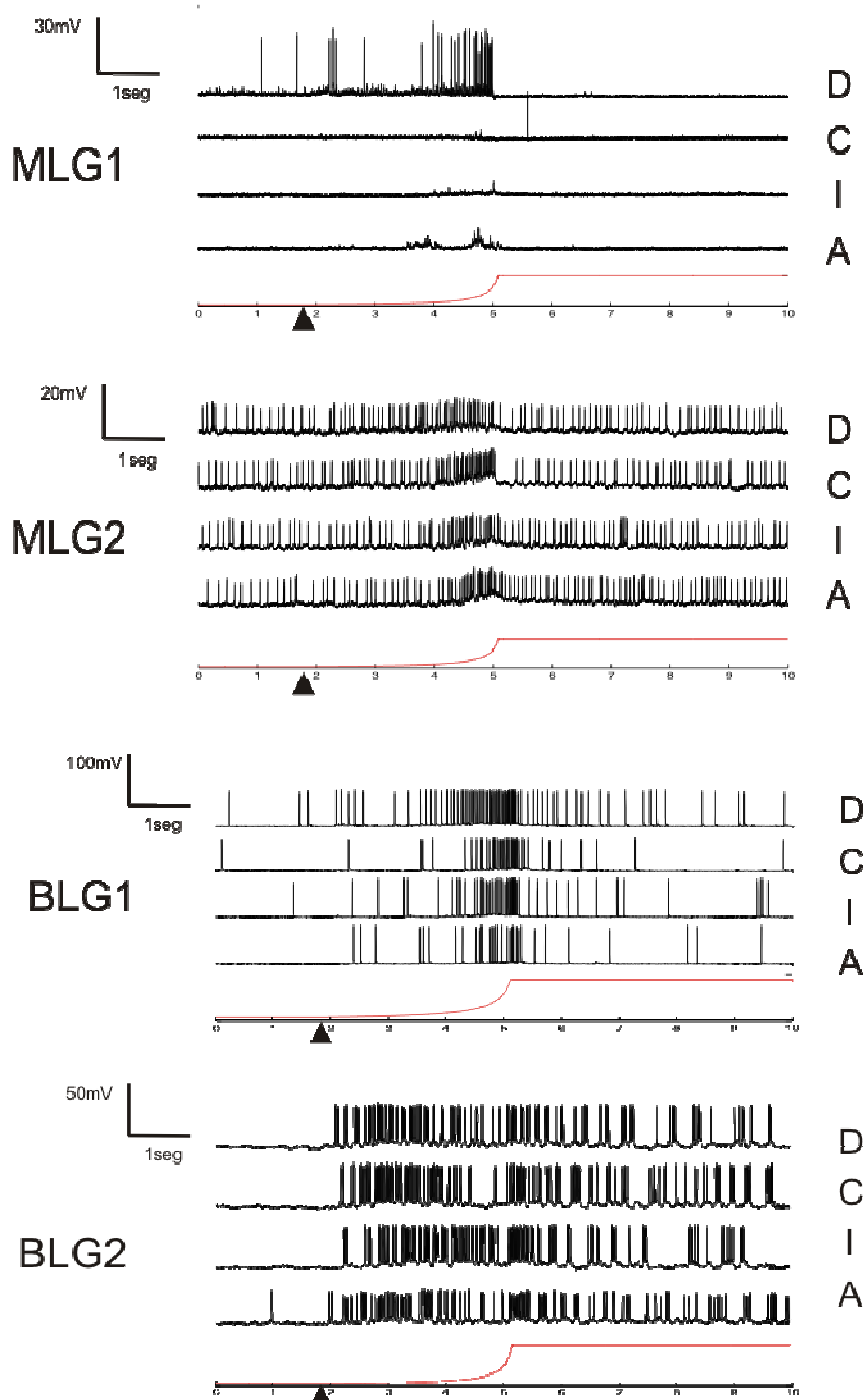
**Figura 5.2- Respuestas típicas de las LG.** (A) un pulso de luz, (B) un objeto de  $14^\circ$  moviéndose tangencialmente a  $48^\circ/\text{s}$ . (C) a un estímulo de aproximación ( $S=70\text{cm}$ ,  $v=285\text{cm/s}$ ). (A) La barra blanca debajo de los registros representa el tiempo en que la luz permanece encendida (Intensidad  $7\text{W/m}^2$ ). (B) La barra negra representa el tiempo de movimiento del cuadrado (1 seg.). (C) La línea curva representa el curso temporal de la expansión.



### **5.2.2- Campos receptivos de las neuronas gigantes de la lóbula tipo MLG1, MGL2, BLG1 y BGL2**

En Medan et al. (2007) se realizó un estudio detallado de los campos receptivos de las neuronas LG utilizando como estímulo un cuadrado (tamaño  $14^\circ$ ) con movimiento lateral horizontal y vertical a una velocidad de  $48^\circ/\text{s}$ . Del análisis posterior de estos resultados, se concluyó que las neuronas MLG1 tienen un campo receptivo acotado de  $51^\circ \pm 15^\circ$  (Medan 2008a,b). Esto corresponde aproximadamente al tamaño angular de un monitor ( $60^\circ$ ), aunque en algunos casos la respuesta puede obtenerse desde 2 monitores, ya que el campo receptivo puede encontrarse ubicado entre ambos. Por otro lado, las neuronas MGL2, BLG1 y BGL2 tienen un campo receptivo amplio que abarca los 4 monitores que rodean al animal. En la figura 5.3 mostramos ejemplos de respuestas a estímulos loomings en los distintos monitores (dinámica  $v=285\text{cm/s}$   $R=70\text{cm}$ ) para los tipos MLG1, MLG2, BLG1 y BGL2. Como se puede ver estos registros son consistentes con los resultados obtenidos en Medan et. al (2007). Para el tipo MLG1 se midieron 8 neuronas y el 50% respondían preferencialmente a estímulos en el monitor central y el otro 50% respondían en el monitor de la derecha. En el caso de los tipos MGL2, BLG1 y BGL2 las respuestas eran intensas en los cuatro monitores. No obstante, mientras que la respuesta de MLG2 y BLG2 son homogéneas a lo largo de todo su campo receptivo, las respuestas de BLG1 son claramente diferentes cuando el estímulo se presenta en distintas partes de su campo receptivo (ver Medan et. al 2007).

Por otra parte, las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1 aumentan su tasa de disparo a medida que el estímulo se expande, mientras que la BLG2 dispara intensamente para ángulos pequeños y luego su actividad decrece a medida que aumenta el tamaño angular del estímulo.



**Figura 5.3- Campo receptivo de las neuronas MLG1, MGL2, BLG1 y BGL2 utilizando estímulos de expansión.** Se aplicaron estímulos looming (trazo rojo) en los monitores de la derecha (D), centro (C), izquierda (I) y Arriba (A). Los cuatro trazos superiores corresponden a una respuesta típica de una neurona MGL1 con campo receptivo en el monitor de la derecha. Los cuatro trazos que siguen abajo corresponden a una neurona MLG2, estas neuronas responden de manera homogénea en los cuatro monitores. Los cuatro trazos que siguen, corresponden a una respuesta típica de una neurona BGL1. Los cuatro trazos inferiores corresponden a una neurona BLG2.

### 5.2.3- Respuestas a estímulos que representan objetos que se acercan (estímulos loomings o de expansión), que se alejan (estímulos receding o de contracción), que se mueven tangencialmente y a oscurecimientos.

Como se mostró en la sección 3.3, la respuesta del animal es mayor para objetos oscuros que se acercan en trayectoria de colisión, que para aproximaciones de objetos claros o para oscurecimientos sin bordes en movimiento. Luego de este resultado comportamental, nos preguntamos si la actividad de las neuronas gigantes de la lóbula tenían propiedades similares o si por el contrario cada tipo neuronal respondería a distintas propiedades del estímulo.

En la figura 5.4 mostramos las respuestas de las neuronas MLG1 y MLG2, y en la figura 5.5 mostramos las respuestas de BGL2 cuando aplicamos estímulos de expansión blancos y negros, de alejamiento negros, de movimiento tangencial y de oscurecimiento.

Para los tipos MLG1 y MGL2 se observa que: a) la respuesta máxima se produce para estímulos de aproximación oscuros, b) la respuesta a un estímulo que se aproxima es mucho mayor que a un objeto del mismo tamaño que se aleja con la misma velocidad, por lo tanto estas neuronas se comportan como detectoras de colisión, c) las expansiones de objetos oscuros respecto al fondo evocan una respuesta superior que para objetos claros, d) las expansiones con bordes oscuros en movimiento evocan respuestas superiores que los oscurecimientos sin movimientos.

En la figura 5.5 podemos apreciar que en el caso del tipo neuronal BLG2, los cinco estímulos generan tasas de disparo máximas con valores similares.

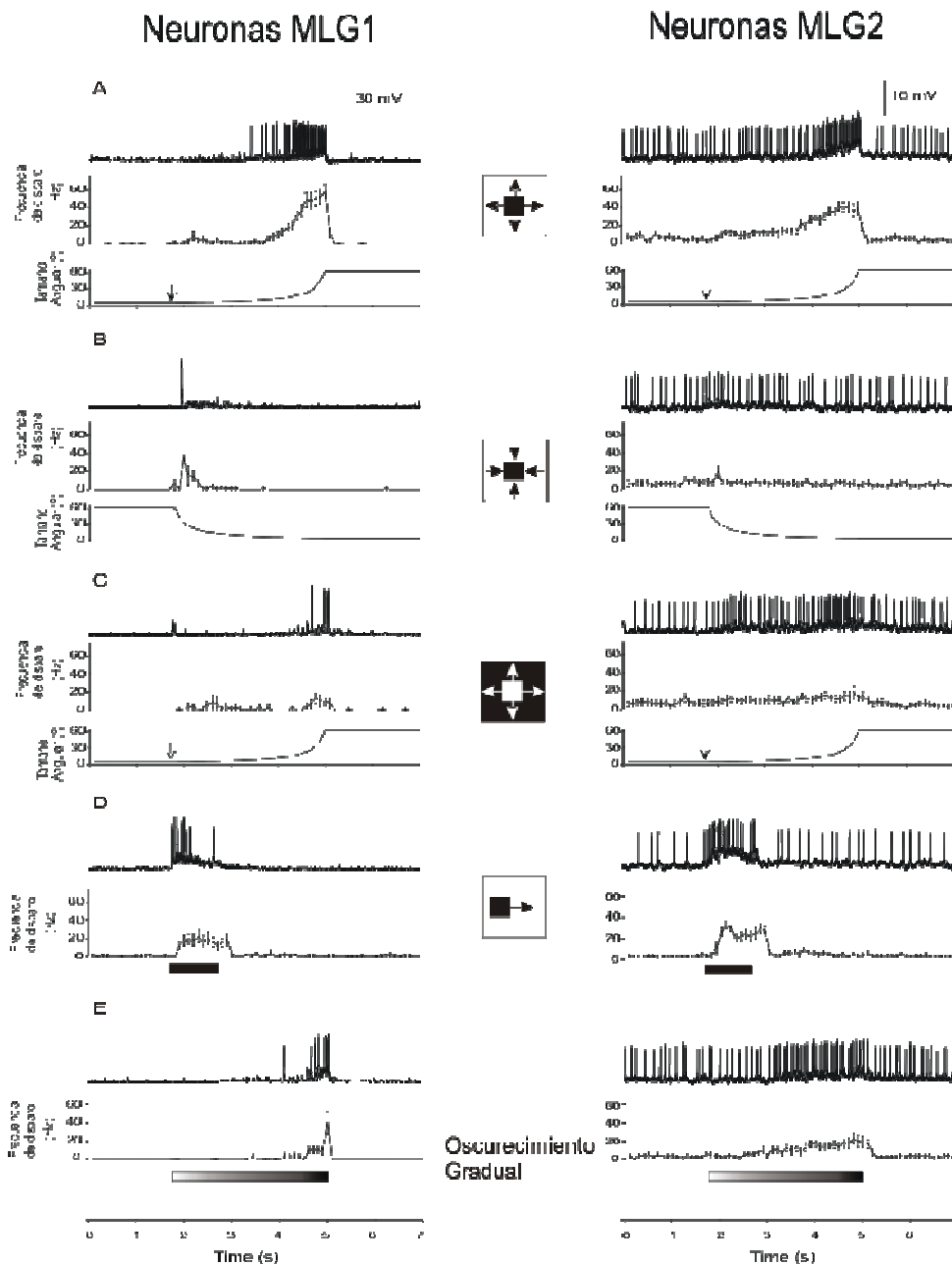
Este protocolo de estimulación fue aplicado a solo dos neuronas BLG1 por lo que no pudimos realizar un análisis estadístico de su respuesta. Sin embargo, las respuestas para estos dos casos generaban respuestas similares a las neuronas tipo MLG2.

Finalmente estudiamos la relación entre la actividad de estas neuronas y la intensidad de la respuesta de escape. Definimos la intensidad de la respuesta neuronal como:

$$Rta = N_{rta} - N_{basal} = \int_{estim} R(t)dt - \int_{estim} R_{basal}(t)dt$$

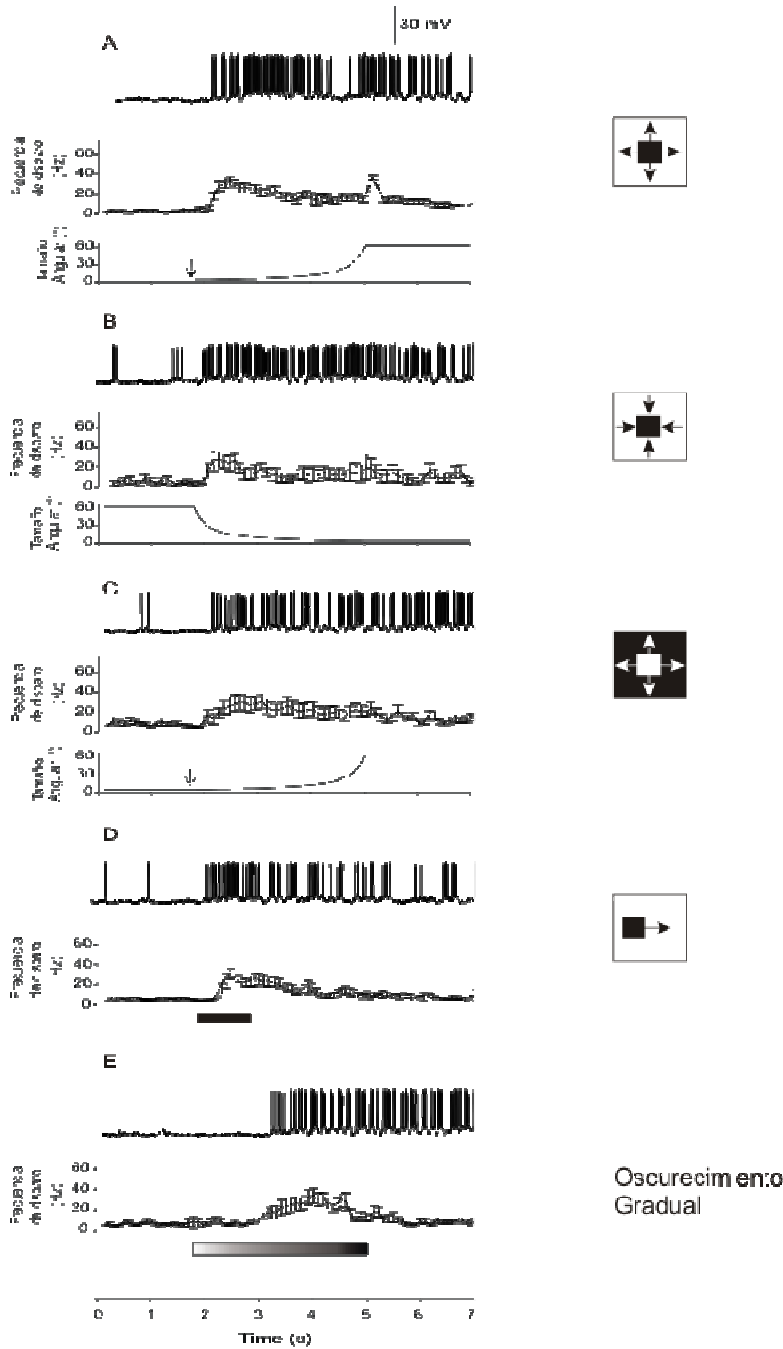
Donde la respuesta es el numero de spikes producidos durante el periodo de estimulación ( $N_{rta}$ ) menos la cantidad de spikes que hubiese generado la neurona con su actividad basal durante el mismo periodo de tiempo ( $N_{basal}$ ). La intensidad de respuesta comportamental se definió como la distancia recorrida en un periodo de 10 segundos desde el inicio del estímulo.

Como se ve en la figura 5.6, la actividad neuronal de MLG1 y MLG2 se corresponde con la intensidad de la respuesta comportamental que desarrolla el animal, mientras que la actividad de BLG2 no lo hace.

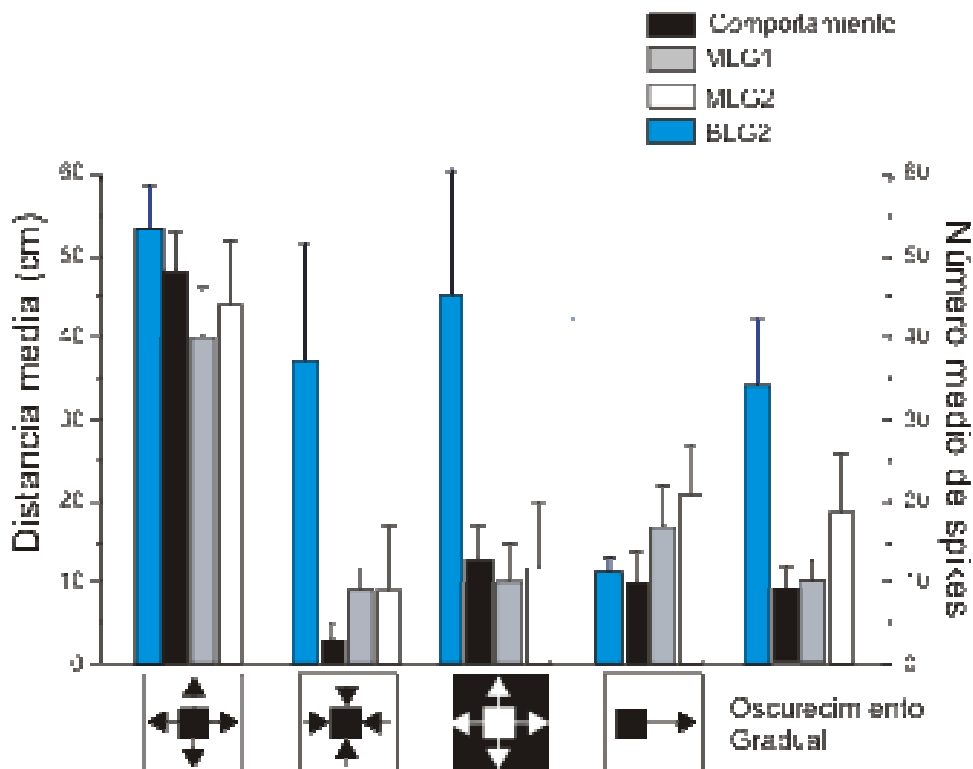


**Figura 5.4- Respuestas de las neuronas MLG1 y MLG2 a distintos tipos de movimientos y contrastes.** (A–E) Resultados con (A) Estímulo looming negro, (B) Estímulo receding negro, (C) Estímulo looming blanco, (D) un cuadrado con movimiento tangencial. (E) un oscurecimiento gradual. En cada panel el trazo superior muestra un registro intracelular de una neurona MLG1 y una neurona MLG2. Los histogramas periéstímulos muestran la media de la tasa de disparo construido con 11 neuronas MLG1 y 13 MLG2 provenientes de diferentes animales (1 trial por estímulo por neurona). Los bins utilizados son de 100ms y se muestra las medias  $\pm$  error standard. El tamaño angular de los estímulos looming y receding se muestran en los trazos inferiores y el comienzo se indica con una flecha. La barra negra representa el movimiento tangencial del cuadrado de 1 seg. de duración. La barra oscurecida representa el oscurecimiento gradual de la pantalla.

## Neuronas BLG2



**Figura 5.5- Respuestas de las neuronas BGL2 a distintos tipos de movimientos y contrastes.** Las referencias son iguales a las de la figura 5.4. Los histogramas periestímulos muestran la media de la tasa de disparo construido con 8 neuronas BLG2 provenientes de diferentes animales (2 trial por estímulo por neurona como máximo).



**Figura 5.6- Comparación de las respuestas comportamentales y neuronales a (A) un looming negro, (B) un receding negro, (C) un looming blanco, (D) un cuadrado con movimiento tangencial, (E) un oscurecimiento gradual de la pantalla.** Las respuestas comportamentales muestran la media y error estándar de la distancia recorrida durante 10 segundos. Las respuestas neuronales de MLG1 y MLG2 corresponden al número total de potenciales de acción emitidos durante el periodo de estimulación. Para las respuestas de MLG2 se restó el número de potenciales de acción correspondiente a la actividad espontánea. Los registros neuronales y comportamentales se realizaron con un ITI de 3 minutos y la presentación de los estímulos fue al azar. Comportamiento,  $N=14$  cangrejos; neuronas: MLG1,  $N=11$ ; MLG2,  $N=13$ ; BLG2,  $N=8$ .

### 5.3- Caracterización de la respuesta de las neuronas gigantes de la lóbula a distintas dinámicas de aproximación.

En las figuras 5.2 y 5.3, mostramos que las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1 aumentan su tasa de disparo mientras se produce la expansión de objetos oscuros y que la intensidad de su respuesta de MLG1 y MLG2 correlaciona con la intensidad de la salida comportamental para una variedad de estímulos que representaban expansiones, contracciones, movimientos laterales y oscurecimientos. Estos resultados sumaron nuevas evidencias acerca de una posible conexión entre la actividad de estas neuronas y el comportamiento de escape (Tomsic et.al 2003). Ahora nos centraremos en estudiar la respuesta neuronal para las dinámicas de expansión utilizadas en los experimentos comportamentales de la sección 4.1. Nuestro objetivo es encontrar una variable óptica de la

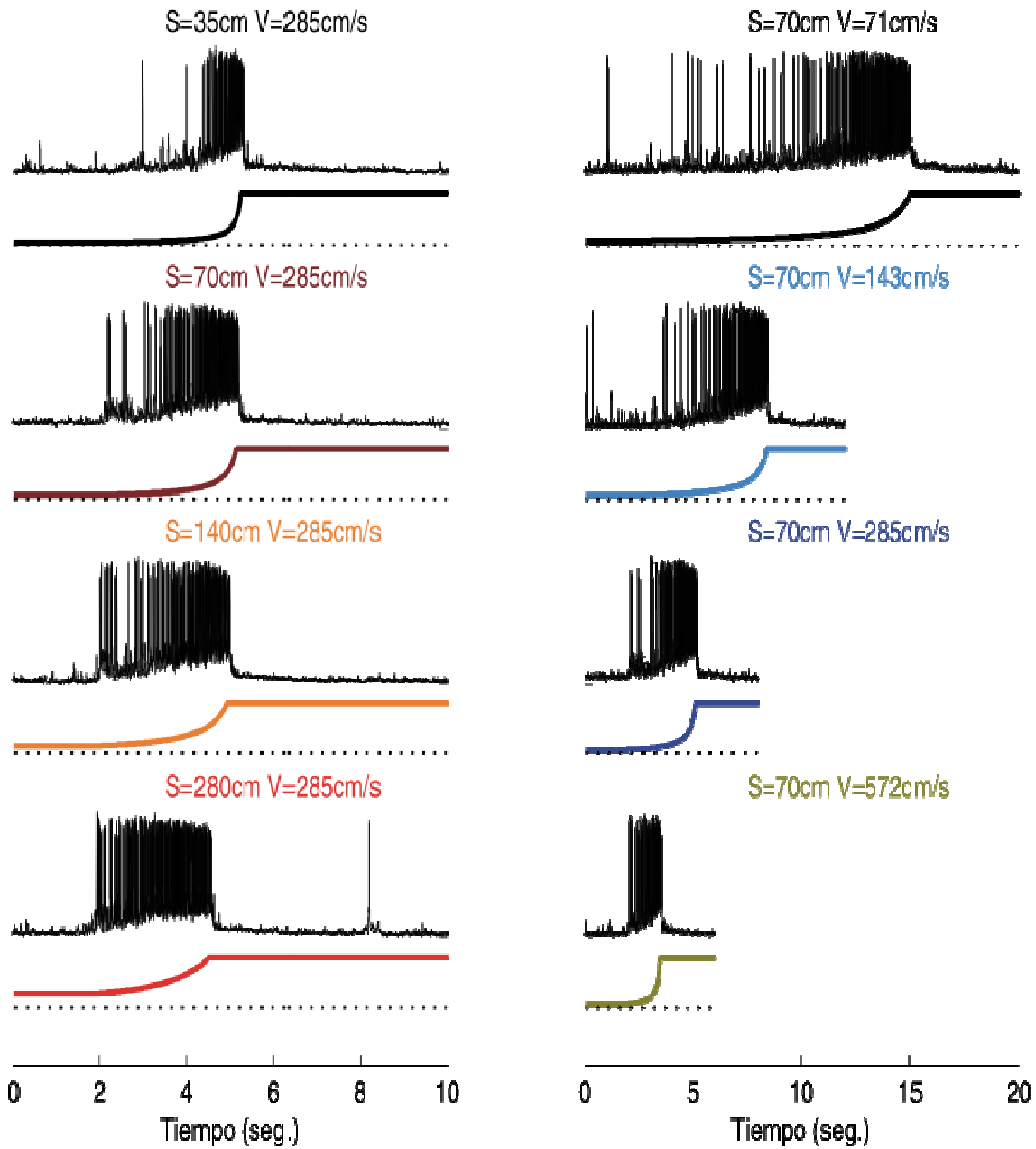
imagen del objeto que se acerca que prediga satisfactoriamente la tasa de disparo neuronal para los 8 estímulos utilizados.

### **5.3.1- Registros de neuronas MLG1, MLG2, BLG1 y BLG2 a distintas dinámicas de aproximación.**

En las figuras 5.7 a 5.10 mostramos registros de neuronas individuales de los tipos MLG1, MLG2, BLG1 y BLG2 a los ocho estímulos de la sección 4.1. En las figuras 5.11 a 5.14 mostramos los histogramas periestímulos medios para cada población de neuronas. En estas figuras, en las columnas de la izquierda se mantiene fija la velocidad de aproximación del objeto ( $V=285\text{cm/s}$ ) y se varia el tamaño  $S$  (desde  $S=35\text{ cm}$  hasta  $280\text{cm}$ ). En las columnas de la derecha, se mantiene fijo el tamaño del objeto ( $S=70\text{ cm}$ ) y se varia la velocidad de aproximación ( $V=71\text{cm/s}$  hasta  $572\text{ cm/s}$ ). Como se puede ver en los registros individuales y en las medias muestrales cualquiera sea la dinámica de expansión, los tipos neuronales MLG1, MLG2 y BLG1 aumentan su tasa de disparo gradualmente mientras se produce la expansión y esta actividad se detiene al finalizar la misma. En cambio, la respuesta de BGL2 es cualitativamente muy distinta. Generalmente se observa una inhibición pequeña al comienzo de las expansiones (ver figura 5.10), luego se observa un incremento considerable aunque transiente de actividad (ver figura 5.10 y 5.14). En efecto, a medida que se desarrolla la expansión la tasa de disparo baja en vez de subir. Además al finalizar la expansión (después de que MLG1, MLG2 y BLG1 se callan) BLG2 tiene un aumento abrupto de actividad que se relaja lentamente.

De esta descripción cualitativa de las respuestas neuronales, podemos concluir que hay al menos dos tipos distintos de respuesta a la información óptica sobre la expansión del estímulo, por un lado las de las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1, que se caracterizan por un aumento en la frecuencia de disparo conforme se expande la imagen, y por otro lado las de las neuronas BLG2, que se caracterizan por una reducción en la frecuencia de disparo a las expansiones de gran tamaño.

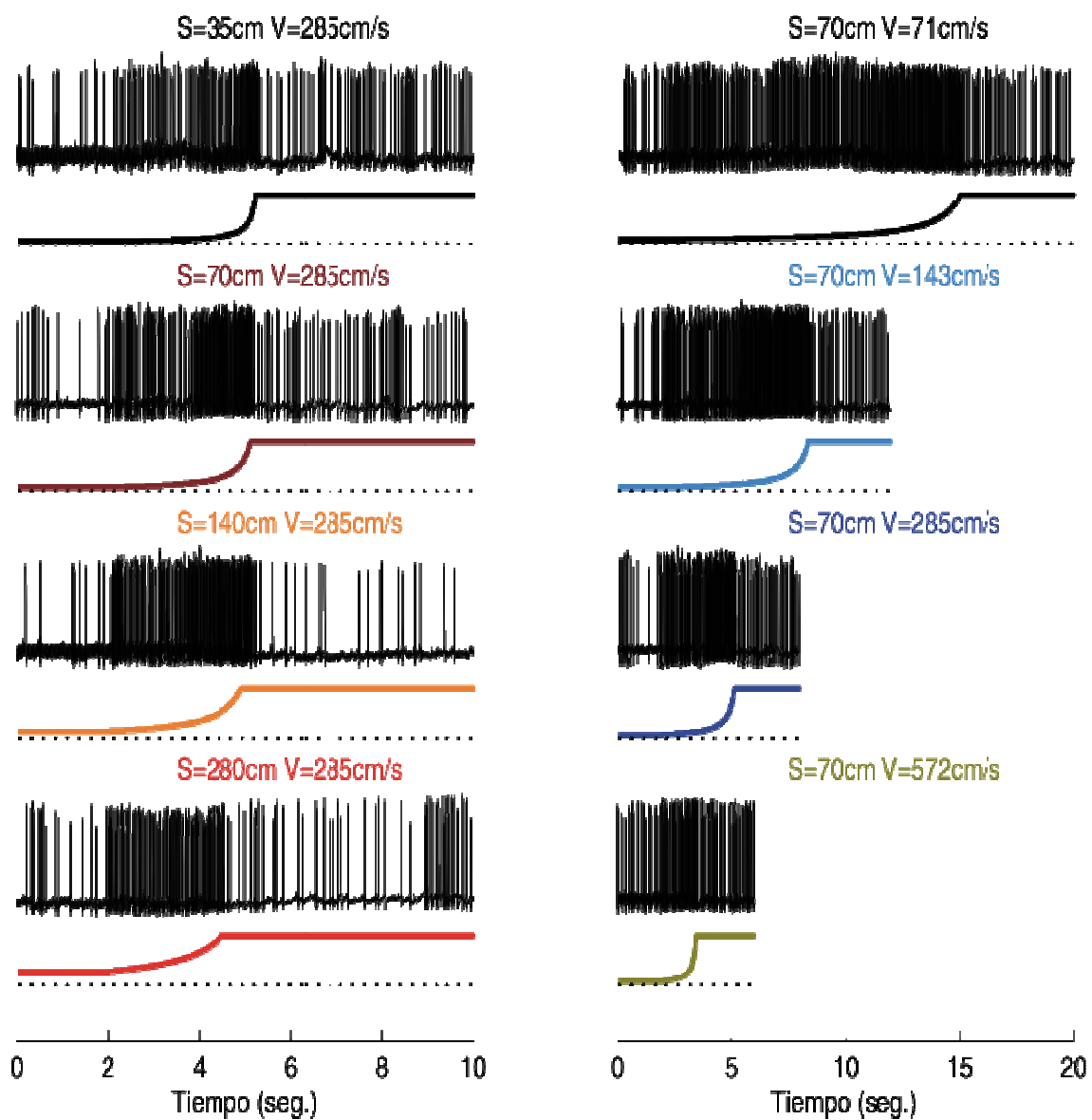
# MLG1



**Figura 5.7: Registros de una neurona MLG1 a los 8 estímulos de expansión correspondientes a distintas dinámicas de aproximación.** (Columna derecha) Respuestas y estímulos 1 a 4 (mantuvimos  $v = 285\text{ cm/s}$  y cambiamos el tamaño  $S$  del objeto). (Columna izquierda) Respuestas y estímulos 5 a 8 (mantuvimos  $S=70\text{ cm}$  y variamos la velocidad  $v$  del objeto). Debajo de cada registro intracelular se muestra el tamaño angular  $\theta(t)$  para cada estímulo. Los ocho estímulos fueron aplicados a cada animal en orden aleatorio. Se utilizó un ITI=1 minuto.

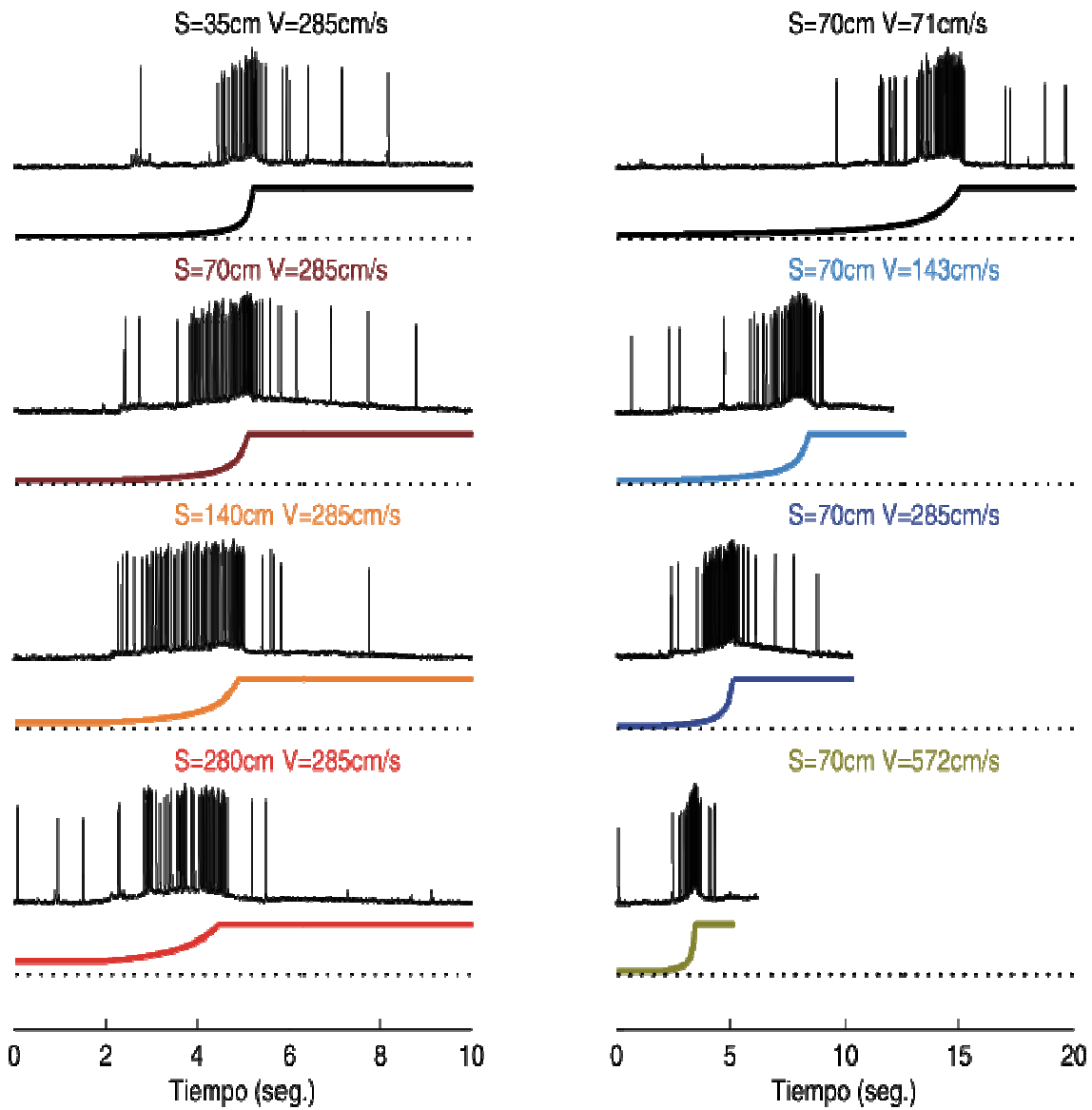


## MLG2



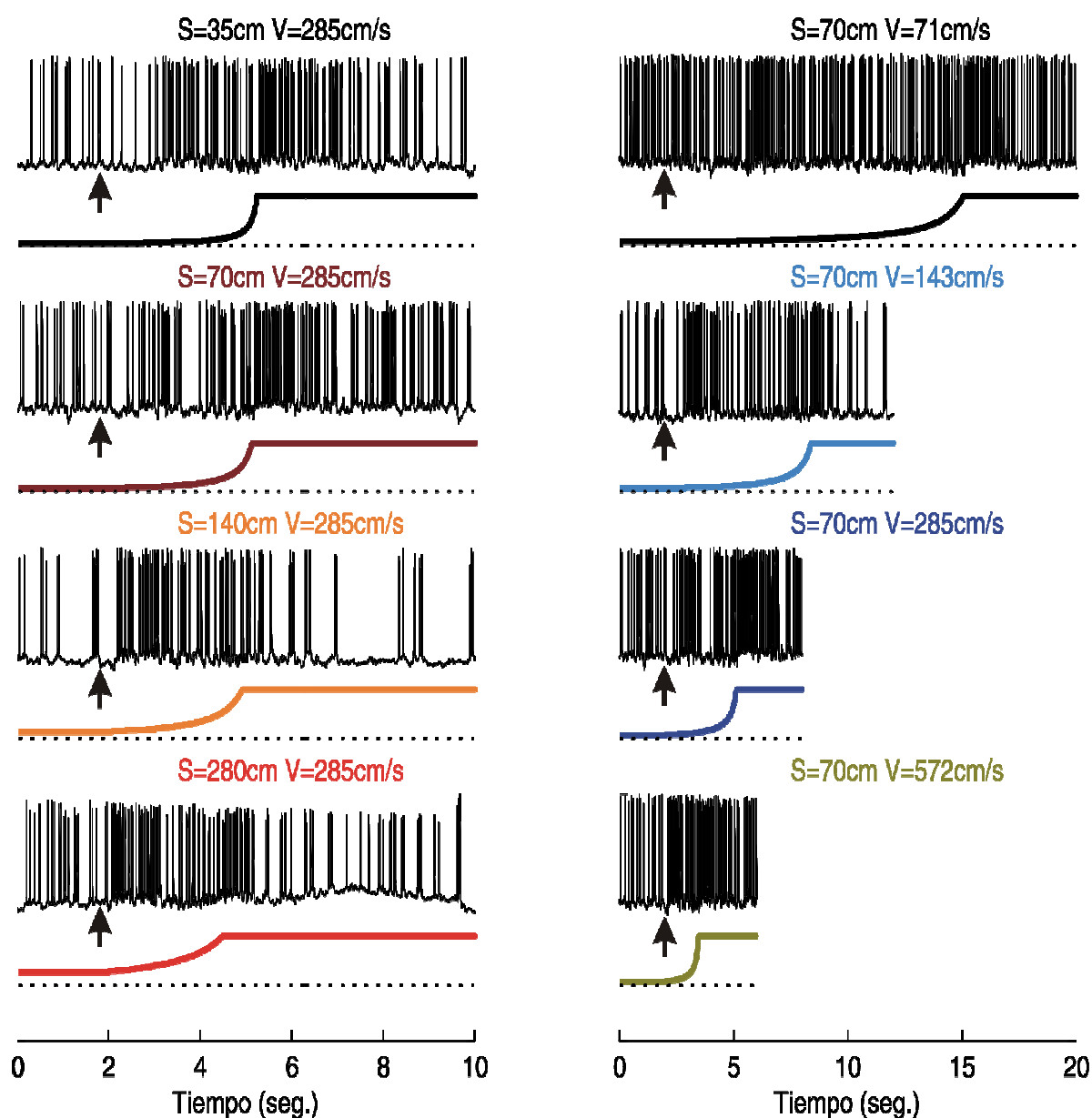
**Figura 5.8:** Registros de una neurona MLG2 a los 8 estímulos de expansión correspondientes a distintas dinámicas de aproximación. Las referencias son iguales a las de la figura 5.7.

## BLG1

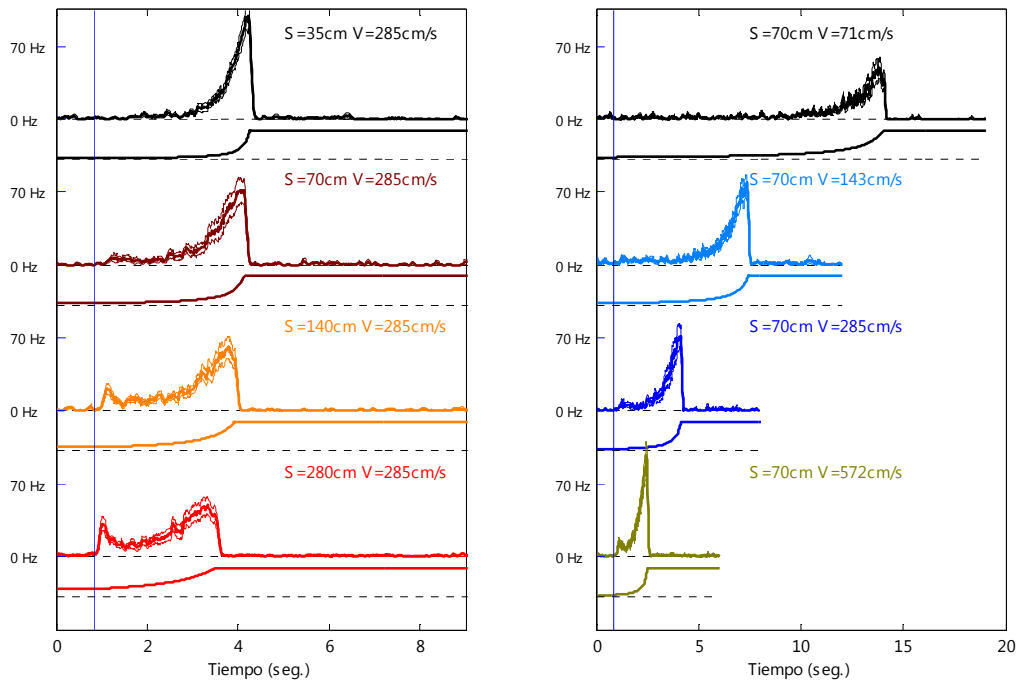


**Figura 5.9:** Registros de una neurona BLG1 a los 8 estímulos de expansión correspondientes a distintas dinámicas de aproximación. Las referencias son iguales a las de la figura 5.7.

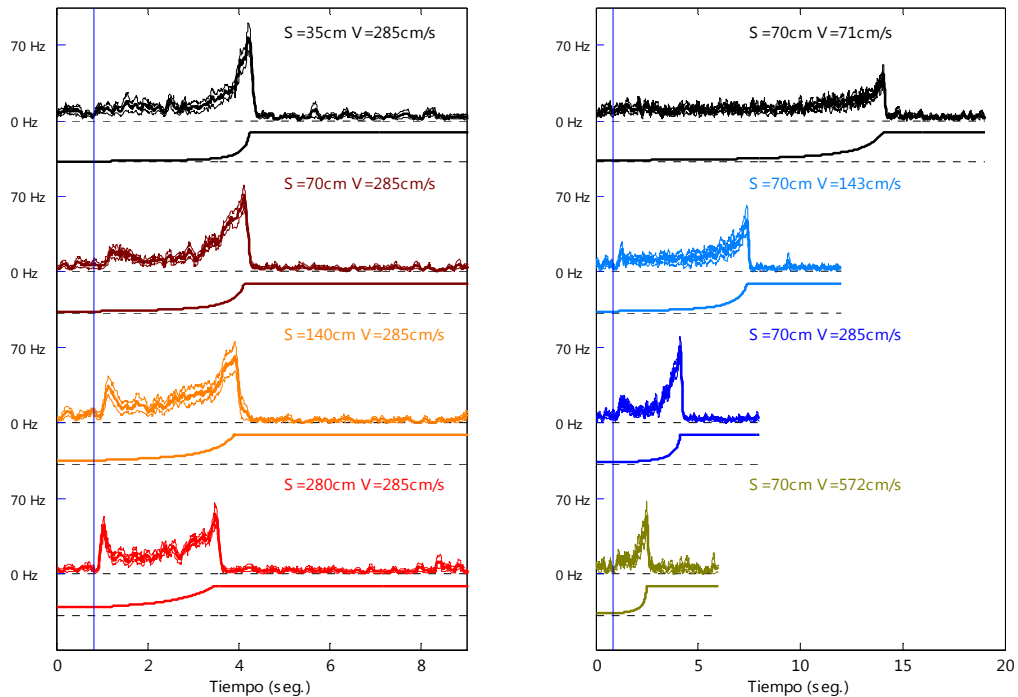
## BLG2



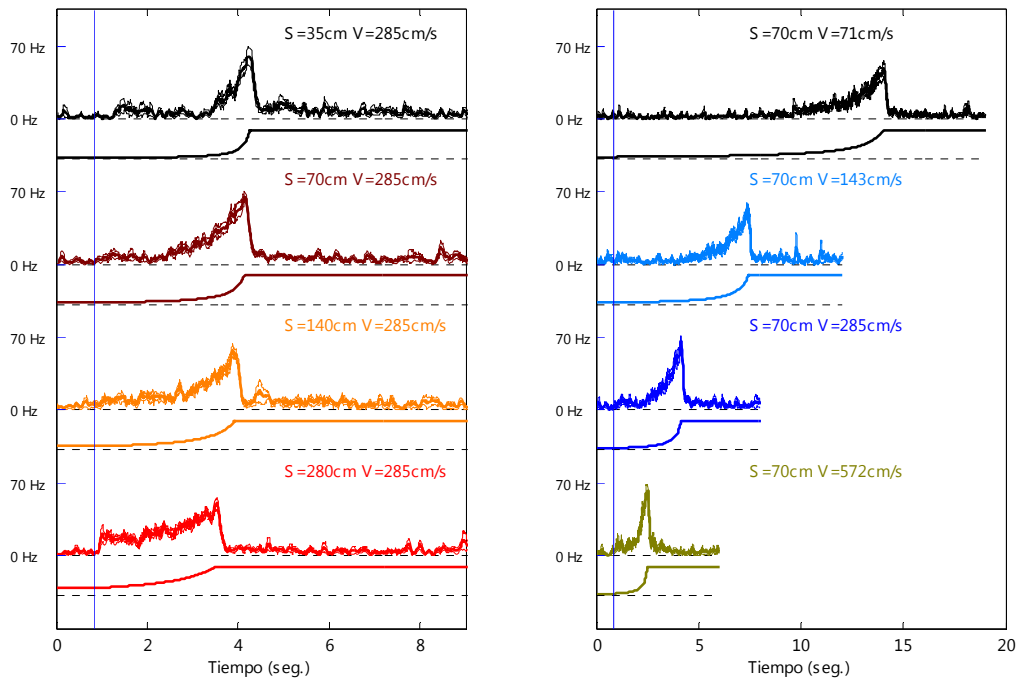
**Figura 5.10: Registros de una neurona BLG2 a los 8 estímulos de expansión correspondientes a distintas dinámicas de aproximación.** Las referencias son iguales a las de la figura 5.7. Las flechas verticales indican el tiempo en el cual comienza la expansión.



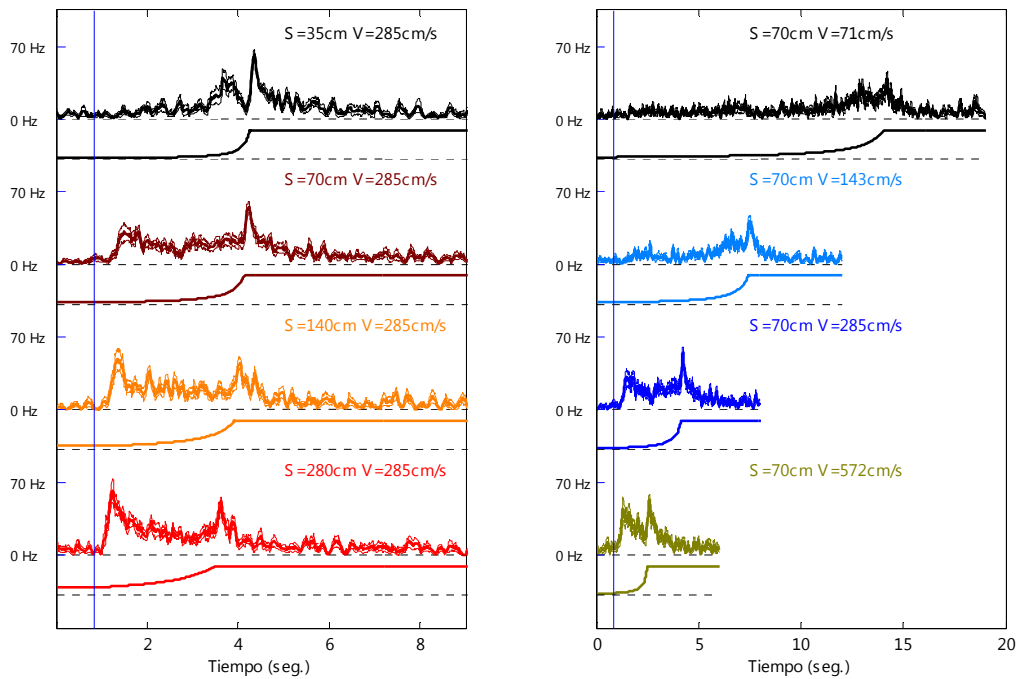
**Figura 5.11: Histograma periestímulo promedio para las neuronas tipo MLG1.** Se utilizaron 20 registros por estímulo de 15 neuronas (no más de dos registros por neurona, cada neurona corresponde a un animal distinto). Se muestran las medias  $\pm$  error estándar. Las líneas azules verticales indican el tiempo en el cual comienza la expansión. Filtrado con ventana cuadrada de ancho 100 ms.



**Figura 5.12: Histograma periestímulo promedio para las neuronas tipo MLG2.** Las referencias son iguales a las de la figura 5.11. Se utilizaron 13 registros por estímulo de 9 neuronas (no más de dos registros por neurona, cada neurona corresponde a un animal distinto). Se muestran las medias  $\pm$  error estándar.



**Figura 5.13: Histograma periéstimulo promedio para las neuronas tipo BLG1.** . Las referencias son iguales a las de la figura 5.11. Se utilizaron 12 registros por estímulo de 8 neuronas (no más de dos registros por neurona, cada neurona corresponde a un animal distinto). Se muestran las medias  $\pm$  error estándar.



**Figura 5.14: Histograma periéstimulo promedio para las neuronas tipo BLG2.** . Las referencias son iguales a las de la figura 5.11. Se utilizaron 11 registros por estímulo de 8 neuronas (no más de dos registros por neurona, cada neurona corresponde a un animal distinto). Se muestran las medias  $\pm$  error estándar.

### 5.3.2- Codificación de MLG1, MLG2 y BLG1 durante la fase de escape a los estímulos visuales.

De la simple observación de los registros individuales y de los promedios de las respuestas de las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1, se tiene la impresión de que sus frecuencias de disparo están fuertemente relacionadas con la dinámica de expansión de la imagen del objeto que se acerca. El objetivo de esta sección es encontrar cual es la variable óptica predice con menor error la tasa de disparo de los tipos neuronales MLG1, MLG2, BLG1.

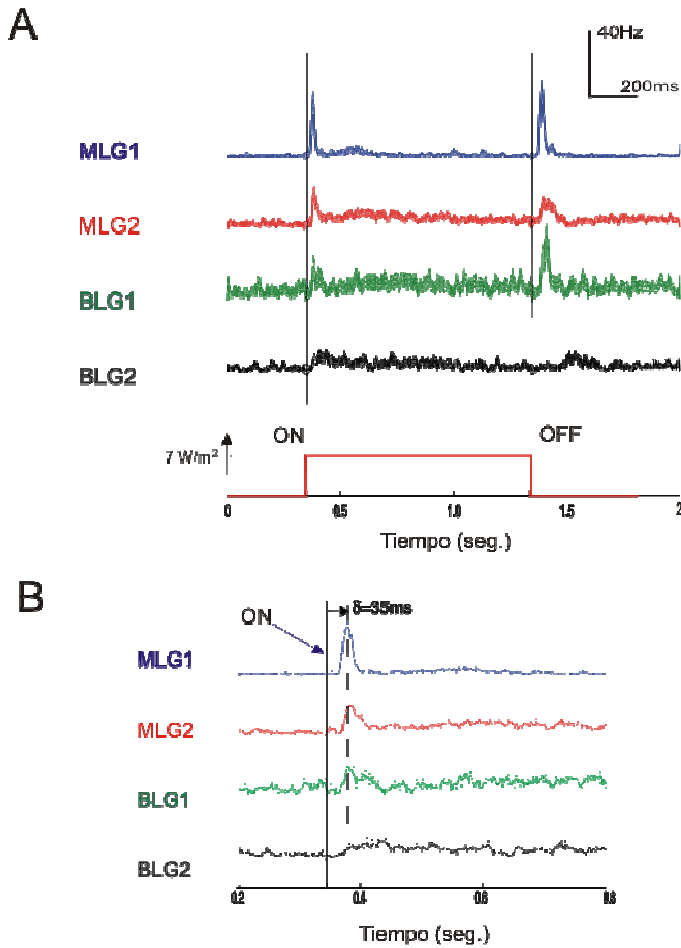
Una simplificación en este primer análisis es que nos centraremos en la información visual que estarían codificando estas neuronas durante la fase de escape. Para esto, analizaremos las respuestas para incrementos angulares  $\Delta\theta \geq \Delta\theta_{escape} \approx 7^\circ$ . Un paso importante para entender el código de estas neuronas es describir la tasa de disparo como:

$$R(t) = F(z(t - \delta)) \quad \text{ec 5.1}$$

donde  $F$  es una función estática,  $z$  es una variable angular (tamaño, incremento, velocidad o aceleración angular),  $t$  es el tiempo, y  $\delta$  es un defasaje entre la entrada visual y la respuesta neuronal.

### 5.3.3- Tiempo de defasaje entre la entrada visual y la respuesta neuronal

Por las mismas razones explicadas para el análisis del retardo entre los momentos de la decisión y la medición de las respuestas comportamentales (ver sección 4.5), para poder ajustar el modelo de la ecuación 5.1, que predice la tasa de disparo neuronal en función de la entrada visual, debemos tener conocimiento del tiempo de defasaje  $\delta$  entre el estímulo y la respuesta neuronal. Para conocer este defasaje, utilizamos un pulso de luz que genera respuestas fásicas que, a diferencia de las obtenidas con estímulos en movimiento, no están temporalmente condicionadas por el ingreso del estímulo dentro del campo receptivo de la neurona (Sztarker y Tomsic 2004). Como se ve en la figura 5.15, estimamos un defasaje promedio que vale  $\delta = 35ms$ . Esta medición está en concordancia con los resultados previos de Medan et.al (2007).



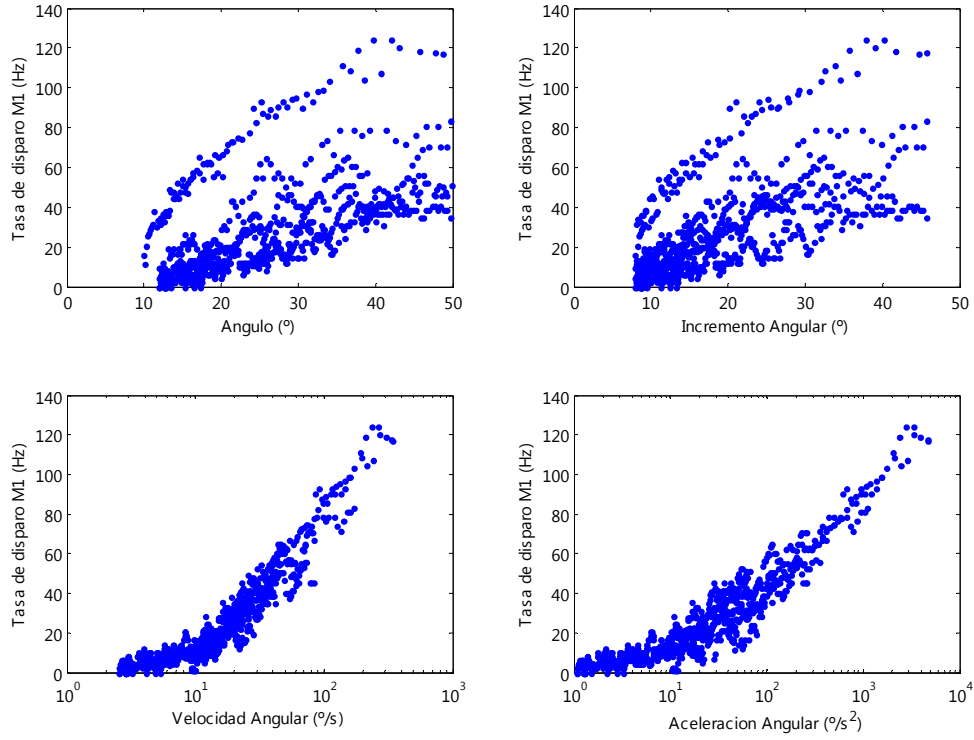
**Figura 5.15: Histograma periestímulo promedio de la respuesta de los distintos tipos neuronales a un pulso de luz.** (A) Respuesta de las LG al inicio y final de un pulso de luz de 1 segundo de duración e intensidad  $7\text{W/m}^2$ . (B) Ampliación de la base temporal de la respuestas de las LG al ON, como se ve el tiempo medio de activación de las neuronas es de aproximadamente  $\delta=35$  ms. Se utilizaron las mismas neuronas de las figuras 5.10 a 5.14, se utilizó un registro por neurona.

#### 5.3.4- Ajuste de la tasa de disparo a un modelo simple de una variable.

Dentro de las variables ópticas que podrían estar codificando las neuronas LG, empezamos por variables angulares simples que mostraron ser útiles en la descripción del comportamiento. Estudiamos la dependencia de la tasa de disparo  $R(t)$ , en función del tamaño  $\theta(t-\delta)$ , incremento  $\Delta\theta(t-\delta)$ , velocidad  $\dot{\theta}(t-\delta)$  y aceleración angular  $\ddot{\theta}(t-\delta)$  de las imágenes de objetos que se acercan.

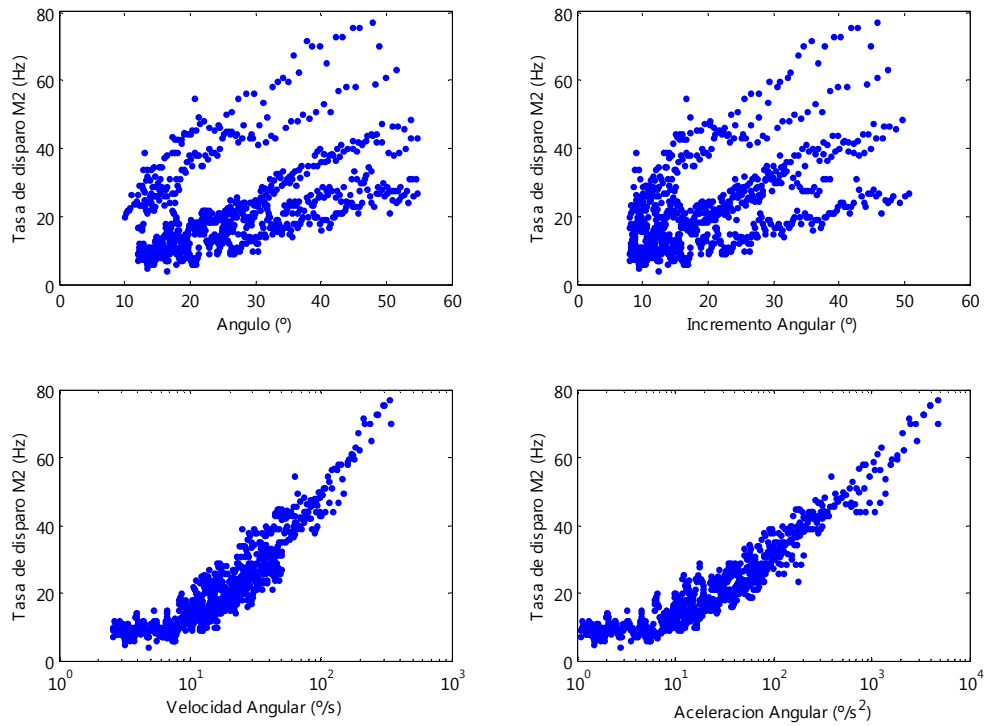
En las figuras 5.16 a 5.18 mostramos la tasa de disparo  $R(t)$  de las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1 en función de las cuatro variables angulares elegidas. Podemos apreciar que en los tres tipos neuronales no se puede describir la respuesta como una función del tamaño o incremento

angular. En efecto, se ve que si fijamos un valor de  $\theta$  o  $\Delta\theta$ , obtenemos distintas tasas de disparo para cada una de las 8 dinámicas utilizadas. Sin embargo, cuando graficamos las respuestas en función de cada valor de  $\dot{\theta}$  o  $\ddot{\theta}$  las respuestas tienden a acumularse alrededor de un valor medio para las 8 dinámicas utilizadas.

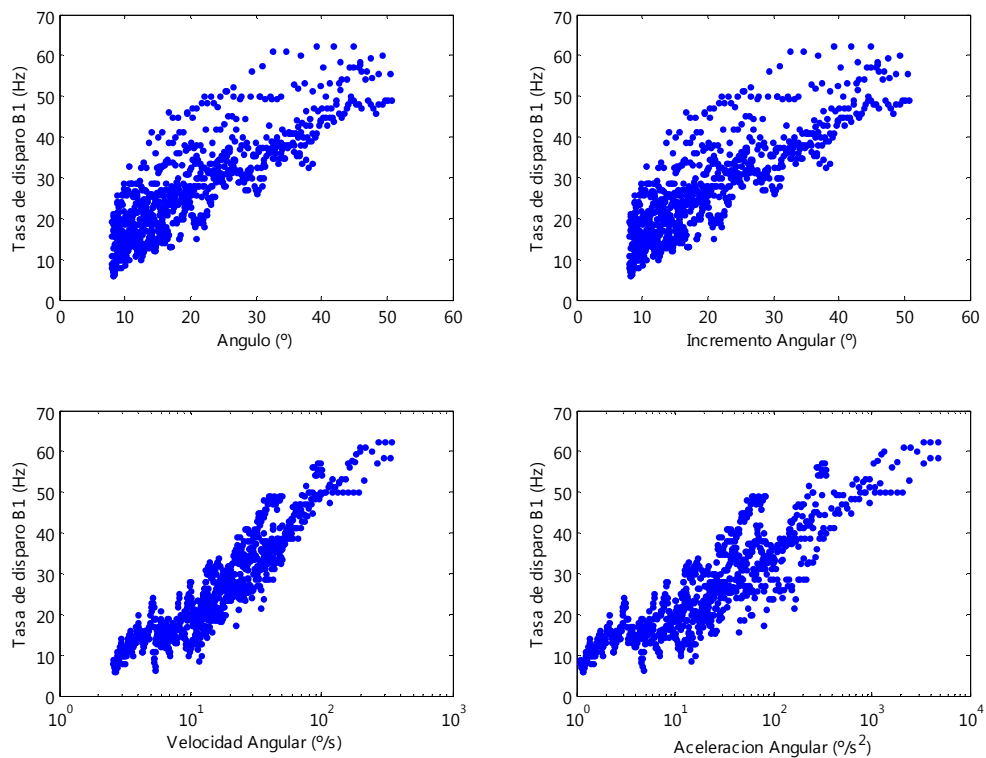


**Figura 5.16:** Tasa de disparo media del tipo neuronal MLG1 en función de cuatro variables ópticas simples. Los datos utilizados son los mismos que en la figura 5.11.





**Figura 5.17:** Tasa de disparo media del tipo neuronal MLG2 en función de cuatro variables ópticas simples. Los datos utilizados son los mismos que en la figura 5.12.



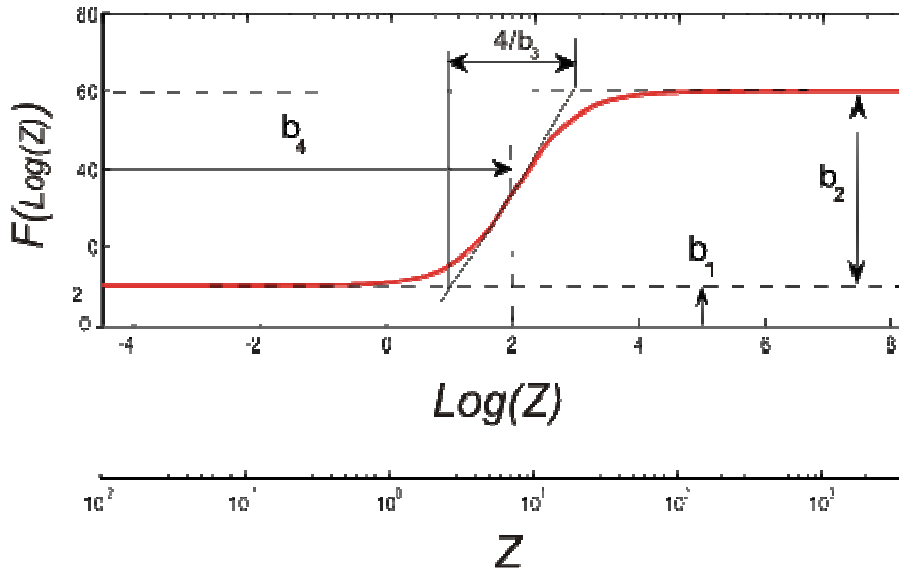
**Figura 5.18:** Tasa de disparo media del tipo neuronal BLG1 en función de cuatro variables ópticas simples. Los datos utilizados son los mismos que en la figura 5.13.

Ahora, nuestro objetivo es encontrar alguna función  $F$  de manera tal que podamos escribir la tasa de disparo como  $R(t) = F_1(\dot{\theta}(t - \delta))$  o como  $R(t) = F_2(\ddot{\theta}(t - \delta))$ , con el valor de defasaje  $\delta$  obtenido en la sección anterior. Utilizamos una función no lineal semejante a la propuesta por Gabbiani et al. (1999), de la forma:

$$R(t) = F(z(t - \delta))$$

$$F(z) = b_1 + \frac{b_2}{1 + e^{-b_3 \cdot (\log(z) - b_4)}} \quad \text{ec. 5.2}$$

Como mostramos en la figura 5.19, el parámetro  $b_1$  representa la tasa de disparo espontánea,  $b_2$  está relacionado con el valor de saturación de la tasa de disparo,  $b_3$  regula el ancho característico de la no linealidad y  $b_4$  desplaza horizontalmente el centro de la función.



**Figura 5.19: Representación gráfica de la función no lineal  $F$  de la ecuación 5.2.** Ejemplo con valores de los parámetros:  $b_1=10$ ,  $b_2=50$ ,  $b_3=2$ ,  $b_4=2$ . Este grafico muestra la función no lineal en función de la variable  $\log(Z)$  y en función de la variable  $Z$  (en el eje de abscisas inferior que tiene escala logarítmica).

Los parámetros  $(b_1, b_2, b_3, b_4)$  se ajustaron minimizando el error cuadrático medio utilizando rutinas de regresiones no lineales del software Matlab. Nuestro objetivo es cuantificar los errores de predicción de la ecuación 5.2 utilizando 4 posibilidades:  $z = \theta$ ,  $z = \Delta\theta$ ,  $z = \dot{\theta}$ ,  $z = \ddot{\theta}$ . Para cada tipo neuronal, ajustaremos estos 4 modelos y nos quedaremos con el que tiene el menor error de predicción promedio, definido como:

$$E_p = \frac{1}{N_s} \sum_{s=1}^{N_s} \frac{1}{N_t} \sum_t |R_s(t) - F(z_s(t - \delta))|$$

Donde  $N_s = 8$  es el número de estímulos,  $N_t$  es el número de mediciones para el estímulo  $S$ ,  $R_s(t)$  es la tasa de disparo medida y  $F(z_s(t - \delta))$  es la predicción del modelo.

Para cuantificar la dispersión del error de predicción  $E_p$  y de los parámetros ( $b_1, b_2, b_3, b_4$ ) para cada modelo utilizamos el método de bootstrap (Wasserman 2004). En la tabla 5.2 mostramos los errores de predicción medios y su dispersión para los cuatro modelos, en los tres tipos neuronales. En el caso de las neuronas MLG1 y BLG1 la variable óptica que predice con menor error la tasa media de disparo es la velocidad angular ( $z = \dot{\theta}$ ), mientras que en el caso de MLG2 es la aceleración angular ( $z = \ddot{\theta}$ ).

	MODELO variables	Error medio (Hz) MLG1 ± Desvío Estándar	Error medio (Hz) MGL2 ± Desvío Estándar	Error medio (s.f.) BGL1 ± Desvío Estándar
1	$Z = (\Delta\theta)$	13.8±1.6	7.8±0.75	5.6±0.6
2	$Z = (\theta)$	13.2±1.5	8±0.8	6.4±0.5
3	$Z = (\dot{\theta})$	6.0±0.8 (p=0.07)	4.5±0.5	4.1±0.4 (p=0)
4	$Z = (\ddot{\theta})$	6.5±1	4.25±0.5 (p=0.06)	4.9±0.4

**Tabla 5.2: Error de predicción medio y su desvío estándar de los cuatro modelos de la ecuación 5.2 para las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1.** En tono gris se muestran los modelos con menor error medio de predicción para cada tipo neuronal. Entre paréntesis mostramos los valores de significancia entre los errores de predicción para los modelos  $z = \dot{\theta}$  y  $z = \ddot{\theta}$ .

En la tabla 5.3 informamos los valores medios y el desvío estándar en los parámetros ( $b_1, b_2, b_3, b_4$ ) para los modelos óptimos de la tabla 5.2. En la figura 5.20 mostramos la predicción de los modelos óptimos.

	Modelo elegido	$b_1$ (Hz)	$b_2$ (Hz)	$b_3$	$b_4$
MLG1	$Z = \dot{\theta}$	$-2 \pm 3$	$157 \pm 37$	$1.1 \pm 0.19$	$4.3 \pm 0.4$
MLG2	$Z = \ddot{\theta}$	$5 \pm 3$	$76 \pm 30$	$0.6 \pm 0.18$	$5.5 \pm 1.2$
BLG1	$Z = \dot{\theta}$	$8 \pm 4$	$60 \pm 20$	$1.15 \pm 0.25$	$3.6 \pm 0.45$

Tabla 5.3: Valores obtenidos para los parámetros y su incerteza para los modelos de menor error de predicción.

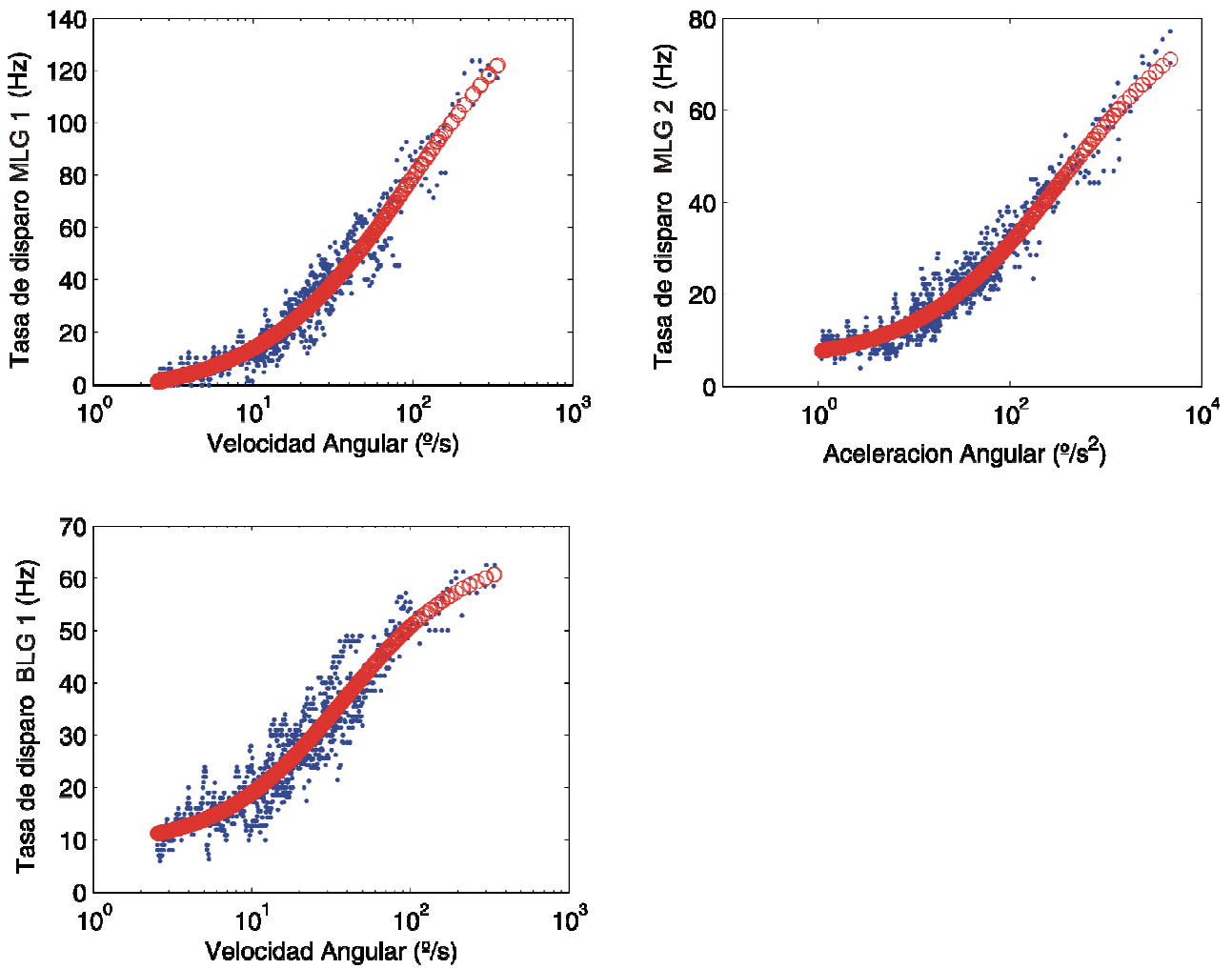


Figura 5.20: Ajustes óptimos para cada los tipos neuronales MLG1, MLG2 y BLG1. Los puntos azules representan la tasa de disparo medida para los 8 estímulos (datos de las figuras 5.11 a 4.13) y los círculos rojos son los ajustes según la ecuación 5.2 y los parámetros de la tabla 5.3.

### 5.3.5- Discusión Rind-Gabbiani

En lo que respecta al procesamiento neuronal frente a estímulos de colisión la respuesta de la neurona LGMD de la langosta es sin duda el modelo mas estudiado, tanto a nivel fisiológico como de modelado.

Para Gabbiani, la LGMD responde a partir de computar información de la velocidad angular y el tamaño angular de la imagen del modo  $z(t) = \log(\dot{\theta}(t) \cdot e^{-\alpha\theta(t)})$ .

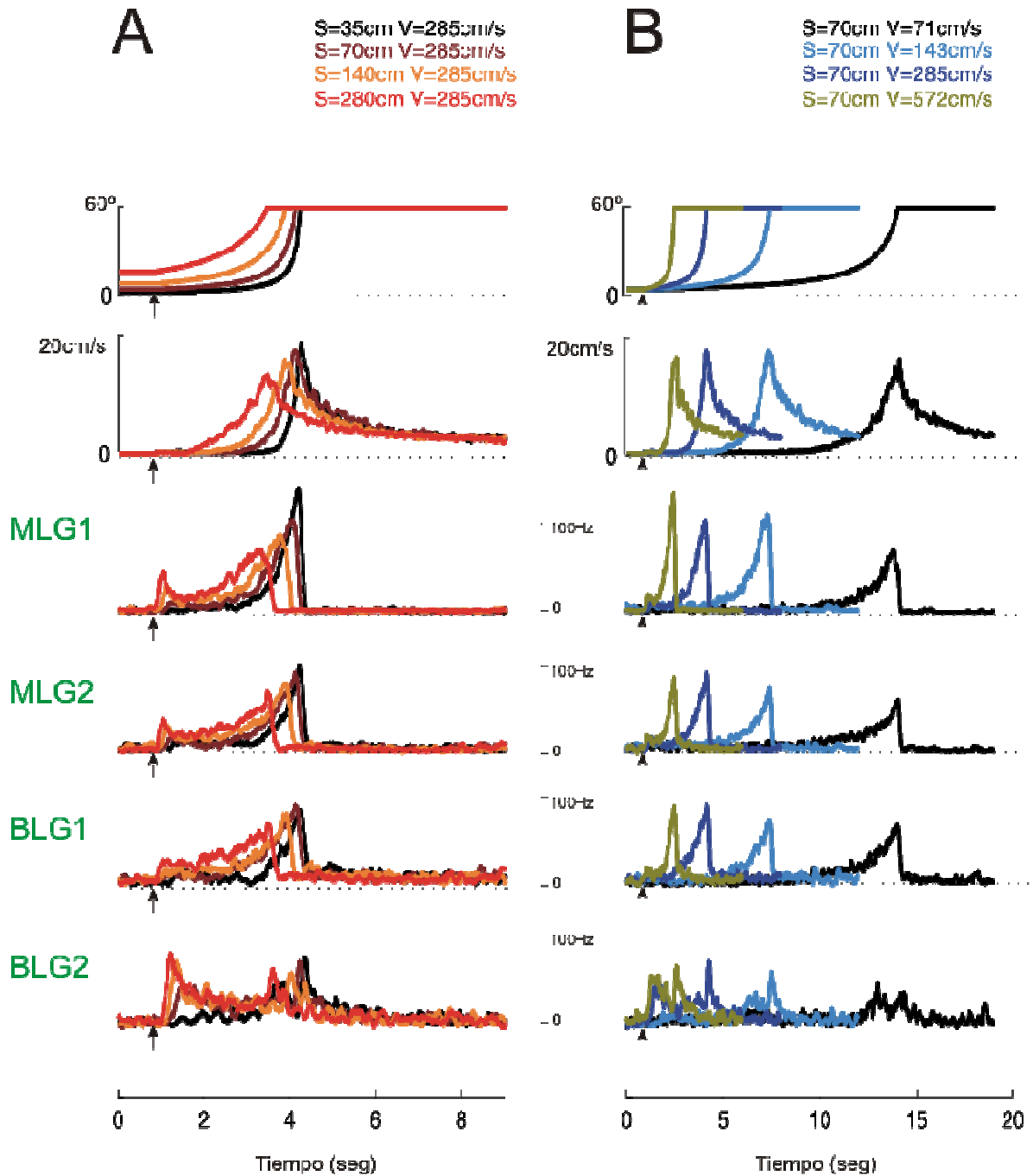
Aunque este modelo explica satisfactoriamente los resultados experimentales de Gabbiani, los estímulos utilizados en sus trabajos parten siempre de tamaños iniciales muy pequeños. Cuando los tamaños iniciales son mayores, como los ocasionalmente utilizados por Rind (Rind & Simmons 1992) la LGMD responde con un incremento abrupto y transiente al inicio del movimiento que no está contemplado en el modelo de Gabbiani. Para salvar esta inconsistencia, Gabbiani propone que esos incrementos iniciales en la respuesta no estarían asociados al computo de algún parámetro particular de la imagen, sino a un fenómeno de adaptación intrínseco de la neurona asociado a la dinámica de sus canales (Perón et. al 2009). Contrariamente de acuerdo a Rind, el incremento transiente estaría relacionado con la discontinuidad en la velocidad angular que se produce al inicio del movimiento, en particular en objetos de tamaño inicial grande. En efecto, al inicio del movimiento se produce el pico de mayor aceleración. Para Rind, entonces, la LGMD responde a partir de computar información de la aceleración de la expansión con  $z(t)$  proporcional a  $\log(\ddot{\theta}(t))$ .

En las figuras 5.11 y 5.12 de esta tesis se puede apreciar que ante estímulos que subtienden ángulos iniciales grandes, las neuronas MLG1 y MLG2 muestran un incremento abrupto de su frecuencia de disparo al inicio del movimiento. Es decir, se comportan igual que las neuronas LGMD de la langosta.

Existen muchos modelos que pueden ajustar los datos. El criterio que nosotros usamos fue el de mantener una descripción simple a través del modelo dado por las ecuaciones 5.2 y 5.3. Esto utiliza como variables ópticas la velocidad  $\dot{\theta}(t - \delta)$  o la aceleración angular  $\ddot{\theta}(t - \delta)$  y permite predecir la respuesta de las neuronas LG a estímulos con otras dinámicas de expansión. Esto nos permitirá en el futuro analizar la validez de este modelo con otras dinámicas de expansión y avanzar en la investigación de su implementación biofísica.

## Capítulo 6 – Relación entre la actividad de las neuronas LG y el escape de *Chasmagnathus* a los estímulos loomings.

Hasta el momento nos concentramos en la caracterización empírica de la respuesta comportamental y de las neuronas LG de *Chasmagnathus* a los estímulos de colisión. Los resultados más importantes de los capítulos 3, 4 y 5 se resumen en la figura 6.1, donde graficamos la velocidad de los animales y la tasa de disparo de los 4 tipos neuronales medidos para las 8 dinámicas de aproximación. En los capítulos 3 y 4 mostramos que la respuesta de escape comienza cuando el estímulo incrementa su tamaño angular en un valor  $\Delta\theta_{escape} \approx 7^\circ$  y que el animal aumenta su velocidad en función de la expansión. En el capítulo 5 mostramos que la tasa de disparo se puede ajustar como una función de la velocidad o la aceleración angular cuando se cumple  $\Delta\theta \geq \Delta\theta_{escape}$ . En este capítulo estudiaremos la relación entre la actividad de las neuronas LG y la respuesta comportamental del animal a los estímulos de colisión. Nuestro objetivo es construir un modelo simple de como las neuronas podrían procesar la información de la imagen que se expande para controlar el comienzo y la velocidad del animal en el escape.



**Figura 6.1: Respuestas comportamentales y neuronales a los estímulos de aproximación.** A) Respuestas y estímulos 1 a 4 (mantuvimos  $v = 285 \text{ cm/s}$  y cambiamos el tamaño  $S$  del objeto). B) Respuestas y estímulos 5 a 8 (mantuvimos  $S=70 \text{ cm}$  y variamos la velocidad  $v$  del objeto). En los paneles se muestra: Fila 1) Tamaño angular  $\theta(t)$  para cada estímulo. Fila 2) Velocidad media de los animales (datos correspondientes a la figura 4.1). Fila 3) Tasa de disparo media de las neuronas MLG1 (datos figura 5.11). Fila 4) Tasa de disparo media de las neuronas MLG2 (datos figura 5.12). Fila 5) Tasa de disparo media de las neuronas BLG1 (datos figura 5.13). Fila 6) Tasa de disparo media de las neuronas BLG2 (datos figura 5.14).

## 6.1- Relación entre la actividad de las neuronas LG y el comienzo del escape.

### 6.1.1- Existencia de un criterio de comienzo del escape utilizando información de un único tipo neuronal.

En esta sección nos concentramos en la siguiente pregunta: Dado que conocemos cuando los animales deciden comenzar el escape ante un estímulo looming y que conocemos la actividad de las neuronas LG a esos estímulos, ¿podemos encontrar un criterio sobre la actividad neuronal que prediga el comienzo del escape?

Un análisis similar al que nos proponemos fue realizado por Glantz (1974) donde se estudió la respuesta del levantamiento de quelas del crayfish frente a estímulos que se acercaban (ver capítulo 1). Encontró que la respuesta comenzaba cuando se producía un incremento angular del estímulo de  $\Delta\theta \approx 8^\circ$ . Por otro lado, estudiando extracelularmente las fibras detectoras de movimiento, mostró que la tasa de disparo se podía aproximar por una relación lineal del tipo  $R(t) = k \cdot \dot{\theta}(t)$ . Por lo tanto concluyó que debía existir un integrador temporal de la tasa de disparo (un contador de spikes) que cuando sobrepasaba un número, se disparaba la respuesta motora.

Otro ejemplo es la relación hallada entre la actividad de la neurona LGMD y el comportamiento de escape de la langosta (Fotowat y Gabbiani 2007). En este caso se mostró que el animal adquiere distintas posturas musculares antes de producir el salto y que estas se producen cuando la tasa de disparo de la LGMD toma determinados valores en la tasa de disparo  $R(t)$  de la LGMD.

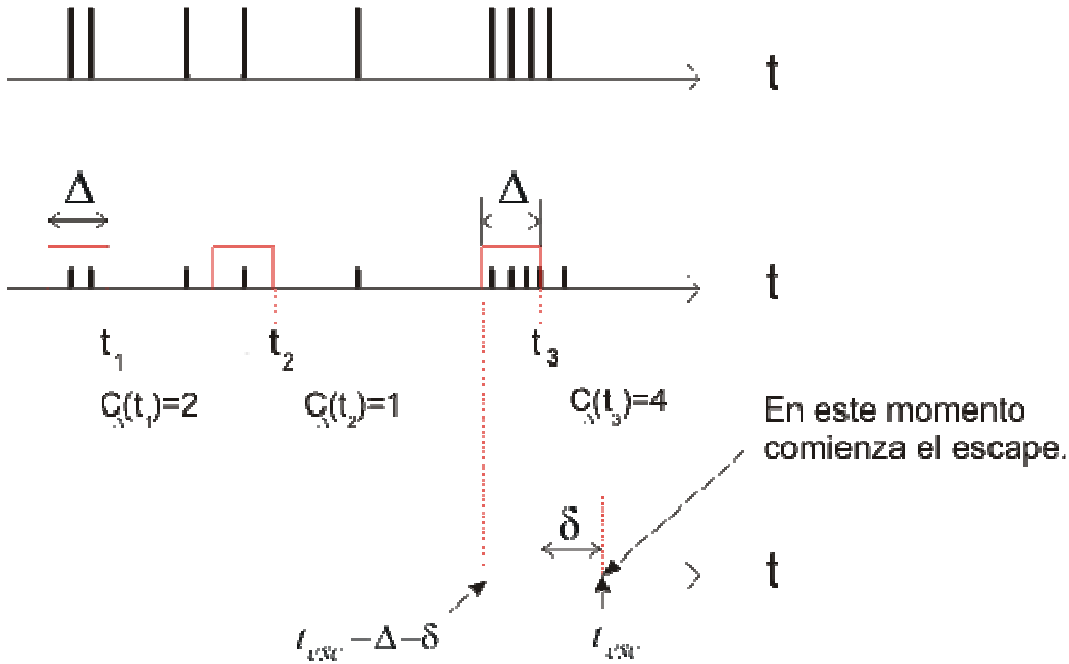
Estos dos ejemplos citados en la bibliografía pueden pensarse como dos casos límites de un contador que suma spikes durante una ventana temporal de  $\Delta$  ms. En el caso del crayfish el acumulador suma desde el comienzo de la expansión hasta que el mismo alcanza el valor umbral. En la langosta el acumulador suma durante un tiempo corto ( $\Delta \approx 20ms$  que es el ancho de la ventana temporal utilizada en Gabbiani et al. 1999 para calcular las tasa de disparo).

Por lo tanto en esta sección supondremos que el comienzo del escape se produce cuando un contador de spikes (que cuenta durante  $\Delta$  ms) sobrepasa un valor umbral. Definimos el estado del integrador de ancho  $\Delta$  como  $C_\Delta(t)$  y  $U_c$  como el valor del umbral que determina el comienzo de la respuesta (ver figura 6.2). Por otro lado, en la sección 4.4 mostramos que el retraso total entre el estímulo visual y la respuesta comportamental es de 150ms y vimos que el retraso promedio entre las neuronas LG y la entrada visual es 35ms. De estos dos hechos concluimos, que el tiempo de retraso entre las neuronas LG y la salida comportamental será aproximadamente 120ms. Bajo estas suposiciones, el estado de integrador en el momento de escape es:



$$C_{\Delta}(t_{esc} - \delta) = \int_{t_{esc} - \Delta - \delta}^{t_{esc} - \delta} R(t') dt' = U_C \quad \text{ec. 6.1}$$

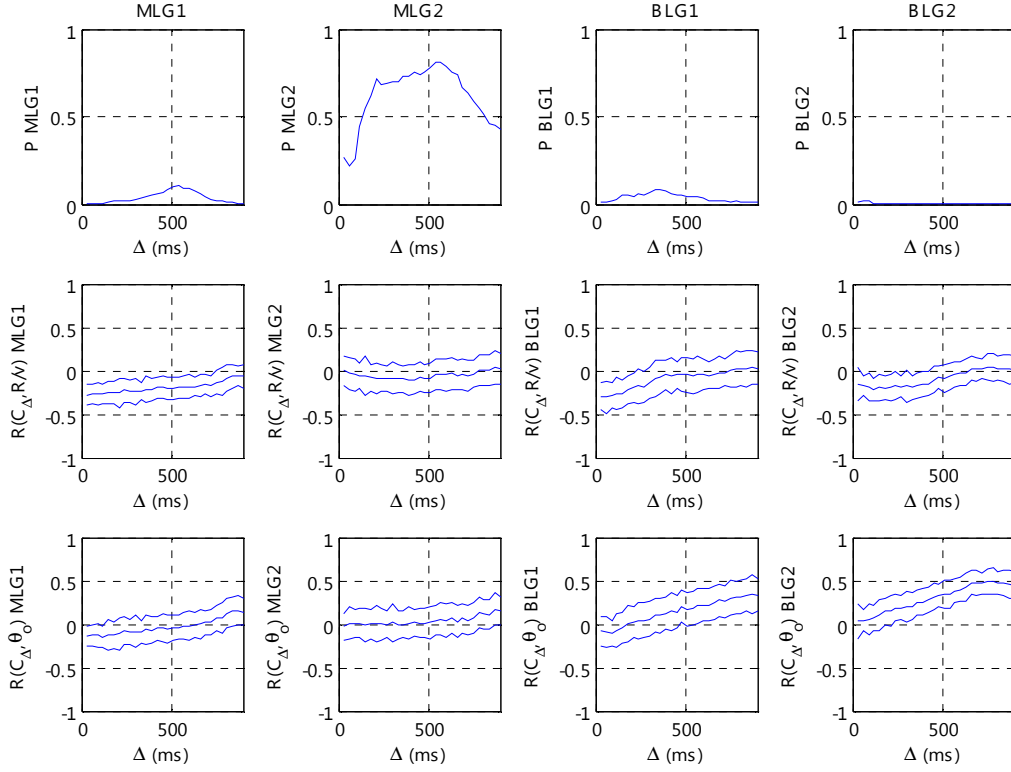
Donde  $t_{esc}$  es el tiempo medio en que se produce el escape cuando se aplica el mismo estímulo que se aplicó a la neurona (ver figura 6.2).



**Figura 6.2: Representación gráfica del contador propuesto  $C_{\Delta}(t)$ .** (Arriba) Secuencia de spikes en función del tiempo. (Medio) El contador de ancho temporal  $\Delta$  está representado por un cuadrado rojo para los tiempos  $t_1$ ,  $t_2$ , y  $t_3$ . Para estos tres tiempos, la suma dio 2, 1 y 4 spikes respectivamente. (Abajo) Si suponemos que el umbral para comenzar el escape es de 4 spikes ( $U_c=4$ ) entonces el animal alcanza este umbral en el tiempo  $t_3$  y desencadena el escape en el tiempo  $t_{esc}=t_3+\delta$ .

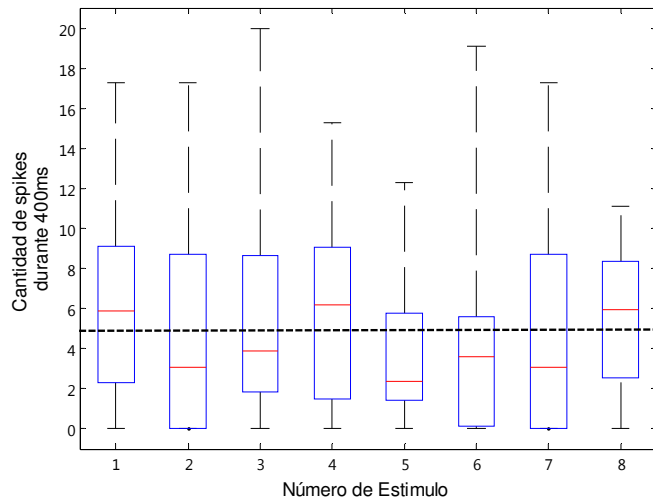
Para analizar si la actividad de alguna neurona cumple esta hipótesis, seguimos el método utilizado en el análisis del comienzo del escape (ver sección 4.3) (Fotowat y Gabbiani 2007). Según este método, lo primero que se debe verificar es una condición suficiente. Esta condición exige que el coeficiente de correlación  $R(C_{\Delta}, R/V)$  entre  $C_{\Delta}$  y el parámetro  $R/V$  sea nulo. Si no fuese nulo, querría decir que el umbral propuesto depende del estímulo y esto no puede suceder ya que en nuestro modelo, el umbral es una propiedad intrínseca del animal independiente del estímulo. Fotowat y Gabbiani solo midieron este coeficiente de correlación, porque el único parámetro que define el estímulo (descrito en función del tiempo a la colisión) es el parámetro  $R/V$ . En nuestro caso, además debemos pedir que el coeficiente de correlación con el tamaño angular inicial del objeto  $\theta_0$ , sea nulo.

En la figura 6.3, en la segunda y tercer fila, se muestran los coeficientes de correlación  $R(C_{\Delta}(t_{esc} - \delta), R/V)$  y  $R(C_{\Delta}(t_{esc} - \delta), \theta_0)$  en función de distintos valores para la ventana temporal de integración  $\Delta$ . En el panel superior se muestran los resultados del test de Kruskal-Wallis para cada tipo neuronal en función de  $\Delta$ .



**Figura 6.3: Existencia de un criterio de comienzo del escape utilizando información de un tipo neuronal.** Cada columna representa un tipo neuronal. En la fila superior, se grafica el valor de significancia (test de Kruskal Wallis) en función del ancho del contador de spikes. En la fila del medio e inferior se grafican los coeficientes de correlación del estado del contador de ancho  $\Delta$  con los parámetros  $R/V$  y  $\theta_0$ . Para estos análisis se utilizaron las mismas neuronas de las figuras 5.11 a 5.14.

De estos gráficos, concluimos que la única neurona que podría enviar spikes al hipotético integrador sería la neurona MLG2. Todos los otros tipos neuronales presentan diferencias significativas en el estado del integrador 120ms antes del escape.



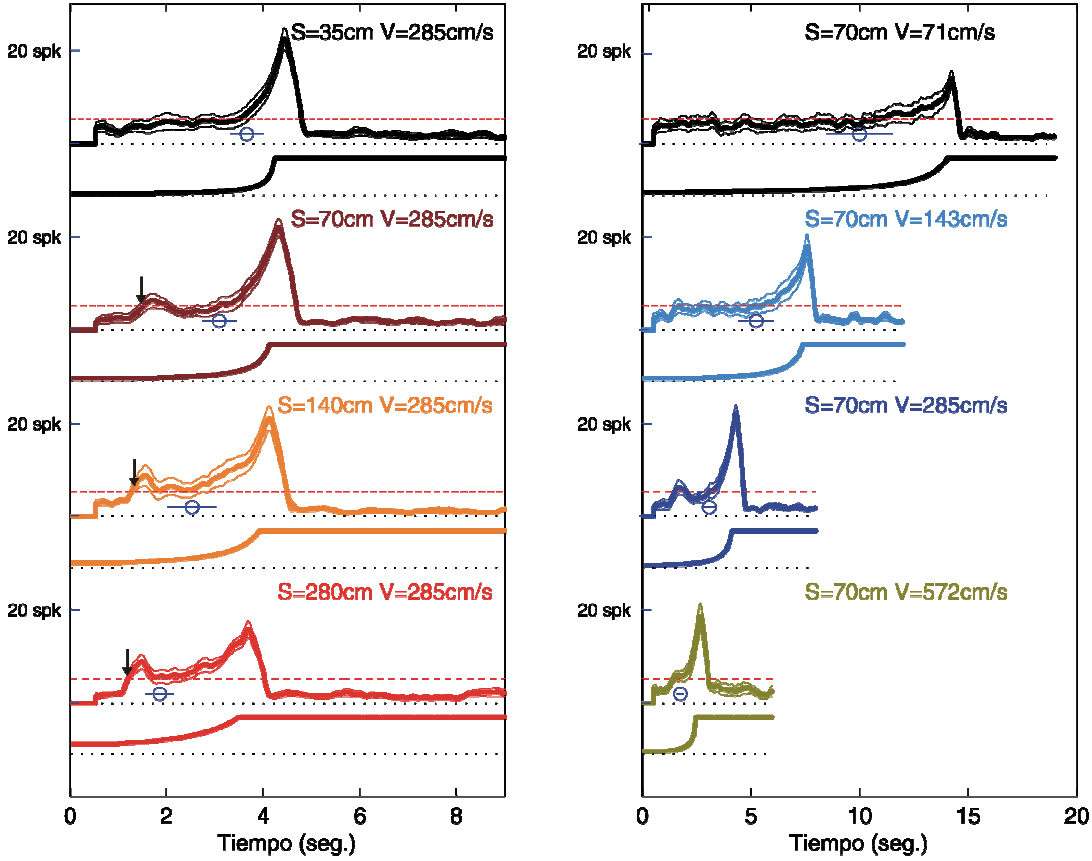
**Figura 6.4: Cantidad de spikes acumulados en un contador de MLG2 ( $\Delta=400\text{ms}$  y  $\delta=120\text{ms}$ )** . En esta figura mostramos del estado del contador de MLG2 ( $\Delta=400\text{ms}$  y  $\delta=120\text{ms}$ ) para los 8 estímulos loomings en el tiempo  $t_{esc}-\delta$ .  $P=0.76$  (KruskalWallis). (N=13 registros de 9 neuronas de distintos animales, como máximo de 2 registros por neurona).

Sin embargo, el acumulador que sumaria spikes de MLG2 presenta un problema grave para explicar el comienzo del escape. En la figura 6.4, mostramos el estado del acumulador  $C_{\Delta}(t-\delta)$  (con  $\Delta=400\text{ms}$  y  $\delta=120\text{ms}$ ) en función del tiempo. Como nuestra hipótesis era que el escape comienza cuando  $C_{\Delta}(t-\delta) \geq U_{\Delta}$  se ve en la figura que el comportamiento de escape no comenzaría solo donde debiera producirse sino antes (ya que el umbral se sobrepasó en momentos anteriores).

Este problema podría resolverse si encontramos otra vía que anule la respuesta de escape en esta región inicial. En la próxima sección analizaremos la posibilidad de que esa segunda vía de señalización este dada por la información de la neurona BLG2.

Finalmente queremos destacar que como vimos existen dos trabajos en los cuales se analizan la actividad neuronal y la salida comportamental. En el trabajo que analiza el levantamiento de quelas en crayfish (Glantz 1974) se supuso un integrador para predecir el comienzo de la respuesta. Por otro lado, en el trabajo en langosta de Fotowat y Gabbiani (2007) se supuso que las respuestas comportamentales se producen cuando la tasa de disparo alcanzan determinados valores. En esta sección mostramos que ninguno de estos dos modelos son satisfactorios para describir el comienzo del escape de *Chasmagnathus* a los estímulos loomings. La falla de ambos modelos se evidencia principalmente en los estímulos 3 y 4 (ver figura 6.5). Cabe destacar, que en la langosta también se

observan aumentos abruptos de la tasa de disparo al comienzo del escape (ver por ejemplo la figura 1.10 extraída de (Simmons et.al. 1992), por lo tanto la conclusión de Fotowat y Gabbiani (2007) presente las mismas limitaciones encontradas en esta sección. En ese trabajo estas limitaciones no se observaron, debido a que los tamaños angulares iniciales  $\theta_0$  eran muy pequeños.



**Figura 6.5: Cantidad de spikes acumulados en un contador de MLG2 ( $\Delta=400\text{ms}$  y  $\delta=120\text{ms}$ ) en función del tiempo.** Los trazos representan el estado del contador (ecuación 6.1) en función del tiempo. Los círculos azules y las barras representan  $t_{esc}-\delta$  y su desvío estándar. En los gráficos se puede ver que por ejemplo para los estímulos 2, 3 y 4 (marrón, naranja y rojo) las flechas muestran que el contador sobrepasa el umbral (líneas rojas punteadas) antes de la condición de escape medida experimentalmente (círculos azules).

### 6.1.2- Codificación de la neurona BLG2 y su relación con los otros tipos neuronales en el comienzo del escape.

Como se ve en la figura 6.1, la evolución de la tasa de disparo en las neuronas BLG2 para los estímulos loomings es cualitativamente distinta a la de los tipos MLG1, MLG2 y BLG1.

Por otro lado, en la sección 6.1.1 analizamos si el comienzo del escape podría explicarse a partir de la integración de un número dado de potenciales de acción en una cierta ventana temporal. Vimos que la única neurona que podría ajustarse al modelo del sumador era la neurona MGL2. Pero esta neurona tiene un problema para predecir el comienzo del escape ya que para algunos estímulos, el umbral del sumador se sobrepasa en momentos anteriores (ver figura 6.5).

Para resolver este problema, analizaremos la relación entre la actividad conjunta de más de un tipo neuronal y el comienzo del escape. En la figura 6.6 se muestra una evidencia sobre la posible relación de la tasa de disparo de las neuronas MLG1 y BLG2 en el comienzo del escape. El trazo azul es la tasa de disparo media de MLG1, el trazo negro es la tasa de disparo media de BLG2. Los círculos rojos indican la tasa de disparo de los dos tipos neuronales 120ms antes del momento del escape. El trazo magenta representa la velocidad media de los animales y el trazo rojo el tamaño angular del estímulo. Como se puede apreciar, en promedio los animales comienzan el escape cuando la tasa de disparo de MLG1 sobrepasa la tasa de disparo de BLG2.

Cabe destacar que los tipos neuronales MLG2 y BLG1 también tienen este comportamiento cualitativo en relación con BLG2.

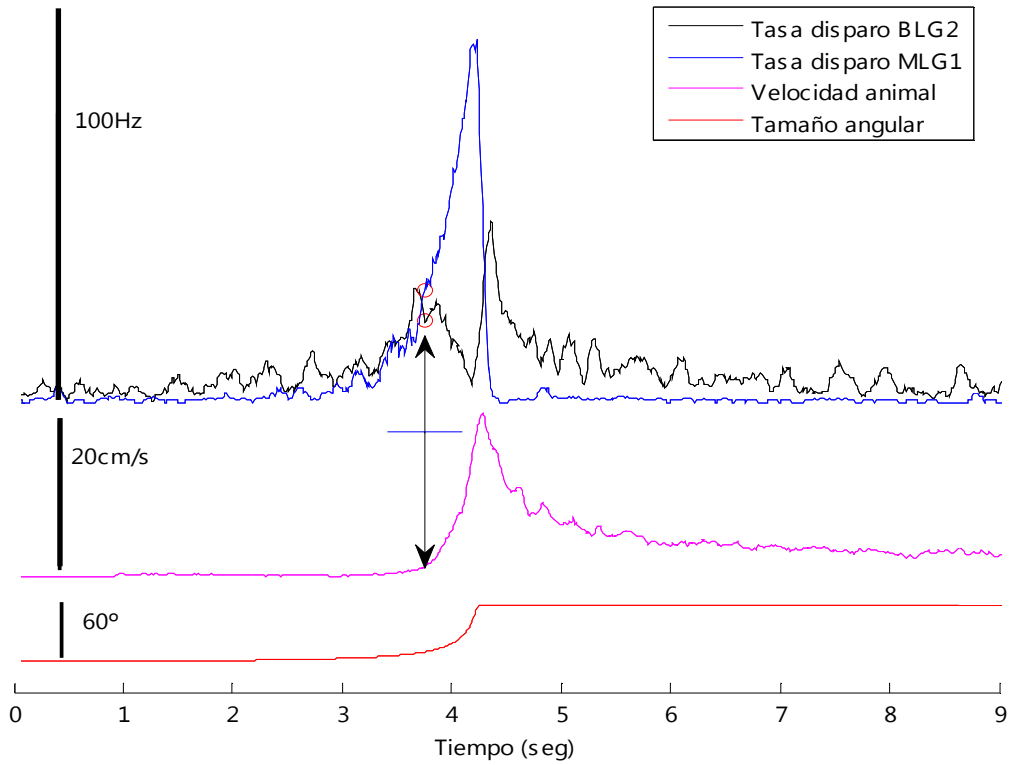
A partir de esta observación, la hipótesis que queremos analizar es *si el comienzo del escape se produce cuando una función  $G$  de la tasa de disparo de MLG1, MLG2 o BLG1 sobrepasa la tasa de disparo de BLG2*.

La observación realizada en la figura 6.6 podría darse solo para el estímulo 1 ( $S=35$ ,  $V=285\text{cm/s}$ ). Cabe entonces preguntarse si tal situación puede extenderse para todos los estímulos: Resumiendo, queremos ver si para todos los estímulos se cumple:

Si  $R_{BLG2}(t - \delta) > G(R_{tipo}(t - \delta))$  es más probable que el animal esté quieto a tiempo  $t$ .

Si  $R_{BLG2}(t - \delta) < G(R_{tipo}(t - \delta))$  es más probable que el animal haya comenzado el escape a tiempo  $t$ .

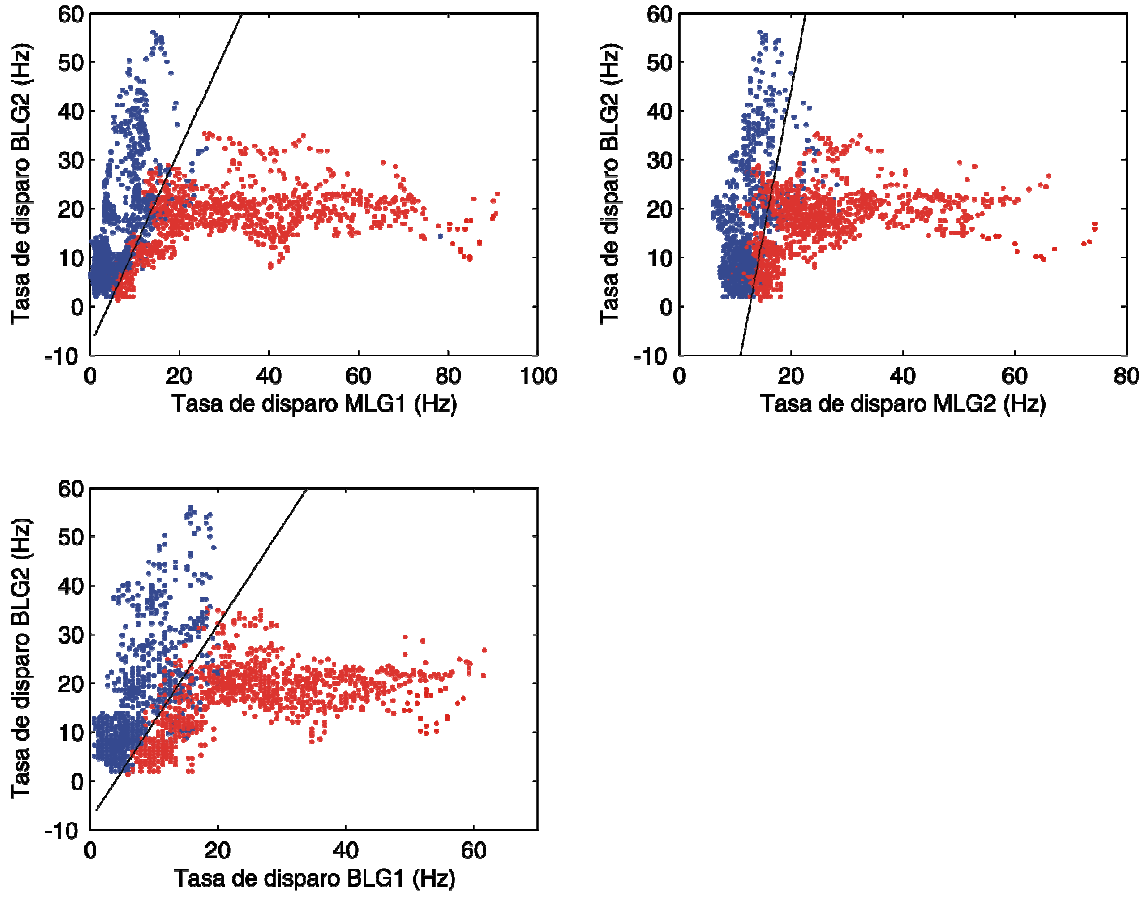
Donde  $tipo = \{MLG1, MLG2, BLG1\}$ .



**Figura 6.6: Tasa de disparo media de MLG1 y BLG2 para el estímulo 1 ( $S=35$ ,  $V=285\text{cm/s}$ ) en el comienzo del escape.** Esta figura muestra una evidencia sobre la posible relación de la tasa de disparo de las neuronas MLG1 y BLG2 en el comienzo del escape. El trazo azul es la tasa de disparo media de MLG1, el trazo negro es la tasa de disparo media de BLG2. Los círculos rojos indican la tasa de disparo de los dos tipos neuronales 120ms antes del tiempo medio del escape. El trazo magenta representa la velocidad media de los animales y el trazo rojo el tamaño angular del estímulo. Como se puede apreciar los animales comienzan el escape (con mayor probabilidad) cuando la tasa de disparo de MLG1 es mayor que la tasa de disparo de BLG2. ( $T_{\text{filtro}}=150\text{ms}$ ).

El estado comportamental más probable fue determinado a partir de las mediciones analizadas en el capítulo 4. Para cada estímulo, sabemos que el estado ‘Quieto’ es más probable en el intervalo  $[t_{\text{stop}} - \delta, t_{\text{escape}} - \delta]$ , donde  $t_{\text{stop}}$  es la mediana de la distribución de tiempos en que los animales que estaban caminando se detienen,  $t_{\text{escape}}$  es la mediana de la distribución de tiempos en que los animales comienzan a escapar y el defasaje  $\delta$  vale  $120\text{ms}$ . Por otro lado, el estado ‘Escape’ es más probable en el intervalo  $[t_{\text{escape}} - \delta, t_{\text{fin}} - \delta]$ ,  $t_{\text{fin}}$  es el tiempo cuando finaliza la expansión.

En la figura 6.7 mostramos las tasas de disparo de los pares (MLG1, BLG2), (MLG2, BLG2) y (BLG1, BLG2). Los círculos azules representan las tasas de disparo neuronal para los tiempos en los cuales el estado más probable es el estado ‘Quieto’. Los círculos rojos representan los valores de tasas de disparo cuando el estado más probable es el de ‘Escape’.



**Figura 6.7:** Tasa de disparo media de los pares (MLG1, BLG2), (MLG2, BLG2) y (BLG1, BLG2) para todos los estímulos. En azul se muestran las tasas de disparo para los tiempos asociados al estado comportamental ‘Quieto’ y en rojo para los tiempos asociados a ‘Escape’. (A) Tasa de disparo media de MLG1 versus Tasa de disparo media de BLG2. (B) Tasa de disparo media de MLG2 versus Tasa de disparo media de BLG2 (C) Tasa de disparo media de BLG1 versus Tasa de disparo media de BLG2. Las líneas rectas representan separatrices entre los dos estados según la ecuación 6.2. ( $T_{filtro}=150ms$ ).

En la figura 6.7 vemos que la función separatriz  $R_{BLG2} = G(R_{tipo})$  puede ser aproximada por una función lineal. De este modo, estará dada por:

$$R_{BLG2} = \alpha_{tipo} \cdot R_{tipo} + \beta_{tipo} \quad \text{ec. 6.2}$$

Donde  $\alpha_{tipo}$  y  $\beta_{tipo}$  son dos coeficientes que determinan la separatriz de cada tipo neuronal. A partir de estas observaciones, queda definido nuestro método de predicción para el estado comportamental más probable cuando utilizamos información dos tipos neuronales:

Si  $R_{BLG2}(t - \delta) > \alpha_{tipo} \cdot R_{tipo}(t - \delta) + \beta_{tipo}$  es más probable que el animal esté quieto a tiempo  $t$ .

Si  $R_{BLG2}(t - \delta) \leq \alpha_{tipo} \cdot R_{tipo}(t - \delta) + \beta_{tipo}$  es más probable que el animal haya comenzado el escape a tiempo  $t$ .

Como se observa en la figura 6.7, las separatrices no producen clasificaciones perfectas, sin embargo, no quedan dudas de que estas poseen una inclinación. Esto quiere decir que utilizando información de tasas de disparo de dos neuronas  $(R_{tipo}, R_{BLG2})$  generaremos mejores predicciones del estado comportamental que utilizando información de un solo tipo neuronal, ya que como se ve, separando los datos con líneas verticales u horizontales siempre separaremos los puntos rojos de los azules con mayor número de errores.

Para cuantificar mejor estas observaciones cualitativas, definimos una medida del error de predicción  $E_p$ , como:

$$E_p = \frac{1}{N_s} \sum_{s=1}^{N_s} \frac{1}{N_t} \sum_t e_p(t, s) \quad \text{ec. 6.3}$$

Donde  $N_s = 8$  es el número de estímulos,  $N_t$  es el número de mediciones para el estímulo  $S$ , y  $e_p(t, s)$  es el error de predicción para el tiempo  $t$  y el estímulo  $S$ : vale  $e_p(t, s) = 0$  si la predicción es correcta y vale  $e_p(t, s) = 1$  si la predicción es incorrecta.

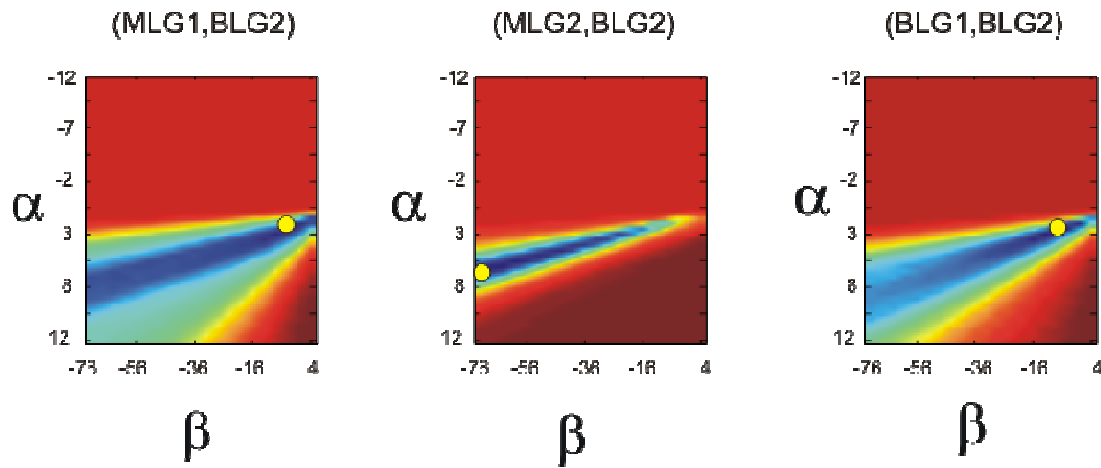
Para buscar los parámetros  $\alpha_{tipo}$  y  $\beta_{tipo}$  que minimizan el error de predicción de la ecuación 6.3, exploramos distintos valores en un rango amplio:  $\alpha_{tipo} \in [-12, +12]$  y  $\beta_{tipo} \in [-75, 4]$ . En la figura 6.8 mostramos el error de predicción  $E_p$  en función de ambos parámetros y los mínimos locales hallados para los tres tipos neuronales.

Una vez determinados los parámetros óptimos para los modelos que utilizan información de 2 tipos neuronales, pasamos a comparar su error de predicción respecto a los modelos que utilizan información de 1 tipo neuronal. Estos modelos suponen que

Si  $R_{tipo}(t - \delta) \leq \alpha_{tipo}$  es más probable que el animal esté quieto a tiempo  $t$ .

Si  $R_{tipo}(t - \delta) > \alpha_{tipo}$  es más probable que el animal haya comenzado el escape a tiempo  $t$ .





**Figura 6.7:** Error de predicción en función de los parámetros  $\alpha_{tipo}$  y  $\beta_{tipo}$ . Los círculos amarillos representan los mínimos locales encontrados.

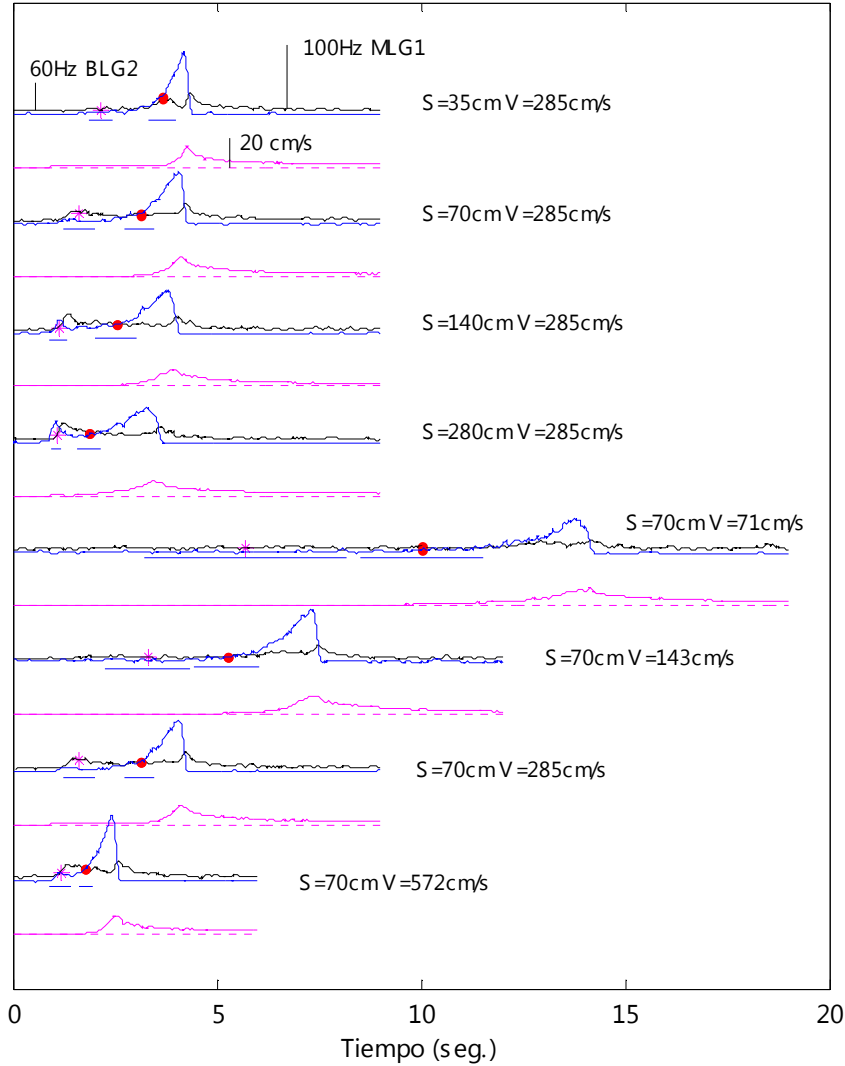
Donde  $\alpha_{tipo}$  es un valor de frecuencia umbral que determina el comienzo del escape. Es importante destacar que este modelo fue analizado en la sección anterior y ahora volvemos a estudiarlos utilizando el error  $E_p$  para ver si mejoramos significativamente las predicciones con un modelo de información de dos tipos neuronales.

En la tabla 6.1 presentamos los errores de predicción, sus incertezas y el valor de los parámetros  $\alpha_{tipo}$  y  $\beta_{tipo}$  óptimos de cada modelo. Nuevamente utilizamos el método de bootstrap (ver capítulo 2 y Wasserman 2004). De esta tabla concluimos que el mejor modelo en la predicción del estado del animal es el que utiliza información del par (MLG1,BLG2) y (BLG1,BLG2).

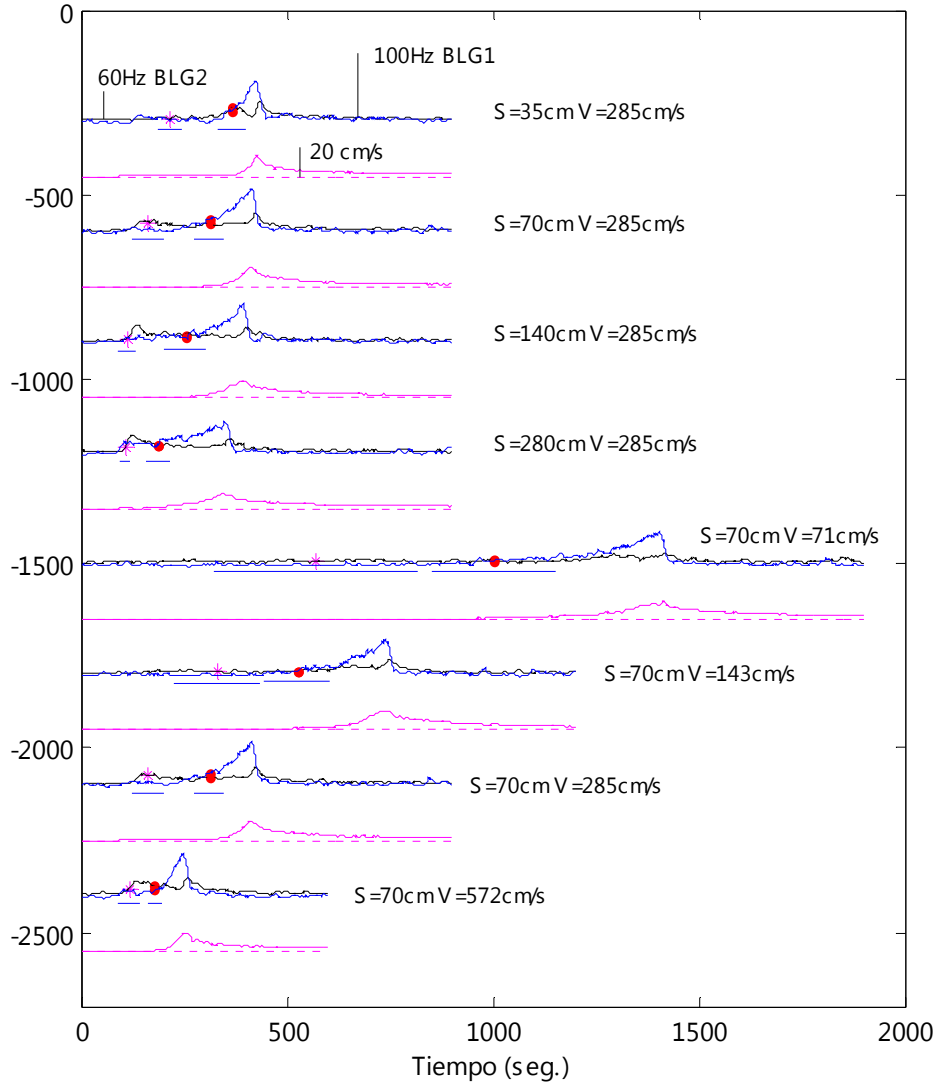
Modelo de predicción	Error medio de Predicción $\pm$ Desvío Estándar	$\alpha_{tipo}$	$\beta_{tipo}$
MLG1	$0.18 \pm 0.02$	14	-
MLG2	$0.22 \pm 0.04$	17	-
BLG1	$0.18 \pm 0.03$	12	-
MLG1-BLG2	$0.14 \pm 0.02$	2	-8
MLG2-BLG2	$0.21 \pm 0.02$	6	-76
BLG1-BLG2	$0.11 \pm 0.02$	2	-8

**Figura 6.1:** Error de predicción, sus incertezas y parámetros óptimos para los modelos del estado comportamental. Los modelos con errores más pequeños son los (MLG1-BLG2) y (BLG1-BLG2) con errores de predicción del 14% y 11% respectivamente. Estos dos modelos presentan diferencias significativas respecto a los demás.

En la figuras 6.7 graficamos  $R_{BLG2}(t)$  y  $\alpha_{tipo} \cdot R_{tipo}(t) + \beta_{tipo}$  para los 8 estímulos loomings testeados para los modelos (MLG1, BLG2) y en la figuras 6.8 para (BLG1, BLG2). Como se ve en las figuras antes del escape se cumple que  $R_{BLG2}(t - \delta) > \alpha_{tipo} \cdot R_{tipo}(t - \delta) + \beta_{tipo}$  y el escape se produce cuando esta desigualdad se revierte.



**Figura 6.7: Tasa de disparo de los tipos neuronales MLG1 y BLG2.** Los trazos azules corresponden a  $\alpha'_{MLG1} \cdot R_{MLG1}(t) + \beta'_{MLG1}$ , donde  $R_{MLG1}(t)$  es la tasa de disparo de MLG1. Los trazos negros corresponden a la tasa de disparo de BLG2,  $R_{BLG2}(t)$ . Las curvas en color magenta indican la velocidad del animal cuando se aplicó el mismo estímulo. Los asteriscos magenta indican el tiempo  $(t_{stop} - \delta)$  y los puntos rojos indican el tiempo  $(t_{esc} - \delta)$  o sea  $\delta$  ms antes de que el animal se quede quieto y comience el escape respectivamente. Las barras horizontales de color azul son la desviación estándar asociada al comienzo del stop y del escape.



**Figura 6.8: Tasa de disparo de los tipos neuronales BLG1 y BLG2.** Los trazos azules corresponden a  $\alpha'_{BLG1} \cdot R_{BLG1}(t) + \beta'_{BLG1}$ , donde  $R_{BLG1}(t)$  es la tasa de disparo de MLG1. Los trazos negros corresponden a la tasa de disparo de BLG2,  $R_{BLG2}(t)$ . Las curvas en color magenta indican la velocidad del animal cuando se aplicó el mismo estímulo. Los asteriscos magenta indican el tiempo  $(t_{\text{stop}} - \delta)$  y los puntos rojos indican el tiempo  $(t_{\text{esc}} - \delta)$  o sea  $\delta$  ms antes de que el animal se quede quieto y comience el escape respectivamente. Las barras horizontales de color azul son la desviación estándar asociada al comienzo del stop y del escape.

Esta hipótesis es muy interesante porque supone que la toma de decisión de comenzar el escape estaría regulada por la interacción de dos tipos neuronales (ver por ejemplo figura 1.4, recuadro C) que codifican las dos vías antes mencionadas. Una vía, informa al animal del comienzo de la expansión (representada principalmente por la neurona BLG2) y luego decae, la otra vía (codificada por BLG1 por ejemplo) va aumentando gradualmente y termina sobrepasando la tasa de disparo de la vía codificada por BLG2.

Al finalizar la expansión, nuevamente la relación se invierte y esto se manifiesta por una reducción muy grande en la velocidad del animal.

### **6.2.1- Modelo propuesto para la relación entre la actividad de las LG y la salida comportamental del animal durante el escape.**

Partiremos de la hipótesis de que las neuronas LG, en particular las de tipo MLG1, MLG2 y BLG1 regulan la velocidad de escape del animal. Suponemos que el aumento de velocidad a un tiempo dado  $(dv_c(t)/dt)$  será proporcional a la tasa de disparo de las neuronas LG que denominamos  $R(t - \delta)$ . Además supondremos que existe un término de relajación proporcional a la velocidad del animal que se puede asociar al rozamiento viscoso de la esfera y también a factores internos del animal que determinan su frenado.

Podemos escribir matemáticamente esta relación del siguiente modo:

$$\frac{dv_c(t)}{dt} = k \cdot R(t - \delta) - \frac{v_c}{\tau} \quad \text{ec. 6.4}$$

Donde  $k$  y  $\tau$  son dos constantes a determinar. El parámetro  $k$  relaciona la actividad neuronal y comportamental, mientras que  $\tau$  determina el tiempo característico de frenado del animal cuando las neuronas vuelven a su actividad basal. Este modelo simple lo podemos asociar físicamente a un cuerpo al que se le aplica una fuerza y tiene un rozamiento viscoso. Pensemos en la metáfora del cuerpo empujado por una fuerza proporcional a  $R(t - \delta)$ . Si la fuerza aumenta, el objeto se mueve cada vez mas rápido, en cuanto la fuerza se anula, la velocidad del animal decaerá con un tiempo característico  $\tau$ . Si es muy grande ( $\tau \rightarrow \infty$ ), el objeto se frenará lentamente y estará moviéndose mucho tiempo a velocidades comparables a la máxima alcanzada. En cambio, si  $\tau \rightarrow 0$  el animal se frenará instantáneamente una vez finalizada la acción de la fuerza.

Volviendo a *Chasmagnathus*, primero debemos aclarar que estamos modelando el comportamiento del animal una vez que comenzó el escape y en este análisis utilizaremos los registros comportamentales cuando la velocidad media es mayor a 3cm/s. Utilizamos este rango porque para velocidades menores a este valor, la distribución de velocidades es bimodal, esto se debe a que tenemos animales quietos (velocidad=0) y animales que ya comenzaron el escape. Para resolver este problema, verificamos que cuando las velocidades medias son mayores a 3cm/s la distribución de las velocidades medidas es unimodal y correctamente aproximada por una distribución gaussiana (test de Lilliefors).

Suponemos que una vez que la actividad de las neuronas sobrepasan la actividad de BLG2, entonces la tasa de disparo de las neuronas MLG1, MLG2 o BGL1 controlarán la aceleración del animal a través del modelo de la ecuación 6.4.

### **Simulación del modelo propuesto y estimación de los parámetros $k$ y $\tau$ óptimos a partir de los datos experimentales.**

Para analizar la validez del modelo propuesto simulamos la evolución de la ecuación diferencial 6.4 para velocidades mayores a 3cm/s en las 8 dinámicas de expansión utilizadas. Llamaremos a las velocidades simuladas  $v_s(t)$  y a las medidas  $v_c(t)$ .

Para cada dinámica de expansión buscamos el tiempo donde la velocidad media de los animales vale 3cm/s y esta situación será la condición inicial de nuestra simulación.

Además para poder simular la respuesta del animal necesitamos conocer los valores de los parámetros  $k$  y  $\tau$ . Como desconocemos el valor de estos parámetros probaremos un amplio rango de valores y nos quedaremos con los que tienen el error mínimo de predicción. El método empleado para la simulación y la búsqueda de los parámetros óptimos se detalla a continuación:

- 1) Elegir un valor de  $k$  y  $\tau$  para la simulación. Se utilizaron  $k$  en el intervalo (0,5) y  $\tau$  en el intervalo (0,4) seg.
- 2) Elegir estímulo  $n$ .
- 3) Encontrar el tiempo  $t_0$  tal que  $v_c(t_0)=3\text{cm/s}$ .
- 4) Tomar como condición inicial de la simulación  $v_s(t_0) = 3\text{cm/s}$
- 5) Simular la velocidad  $v_s(t)$  en tiempos posteriores a la condición inicial  $t_0$  según:

$$v_s(t + dt) = v_s(t) + \left( k \cdot R(t - \delta) - \frac{v_s(t)}{\tau} \right) \cdot dt \quad \text{ec. 6.5}$$

Esta ecuación proviene de discretizar la ecuación 6.4. La función  $R(t - \delta) = F(z(t - \delta))$  se calculó a partir de los modelos de la tasa de disparo del capítulo 5 (ver ecuación 5.2 con los parámetros de la tabla 5.3). Se simuló utilizando la ec. 6.5 (con  $dt=0.01s$ ) para todos los tiempos desde  $t_0$  hasta finalizar la expansión.

6) Repetir desde el paso 2) hasta el 5) para los 8 estímulos de aproximación.

7) Calcular el error absoluto medio de la simulación para los parámetros  $k$  y  $\tau$  elegidos.

$$E_{abs}(k, \tau) = \frac{1}{N_s} \sum_{n=1}^{N_s} \frac{1}{N_t} \sum_t |v_c(t) - v_s(t)| \quad \text{ec. 6.7}$$

8) Volver al paso 1) para simular  $v_s(t)$  con otro conjunto de  $k$  y  $\tau$  del rango propuesto.

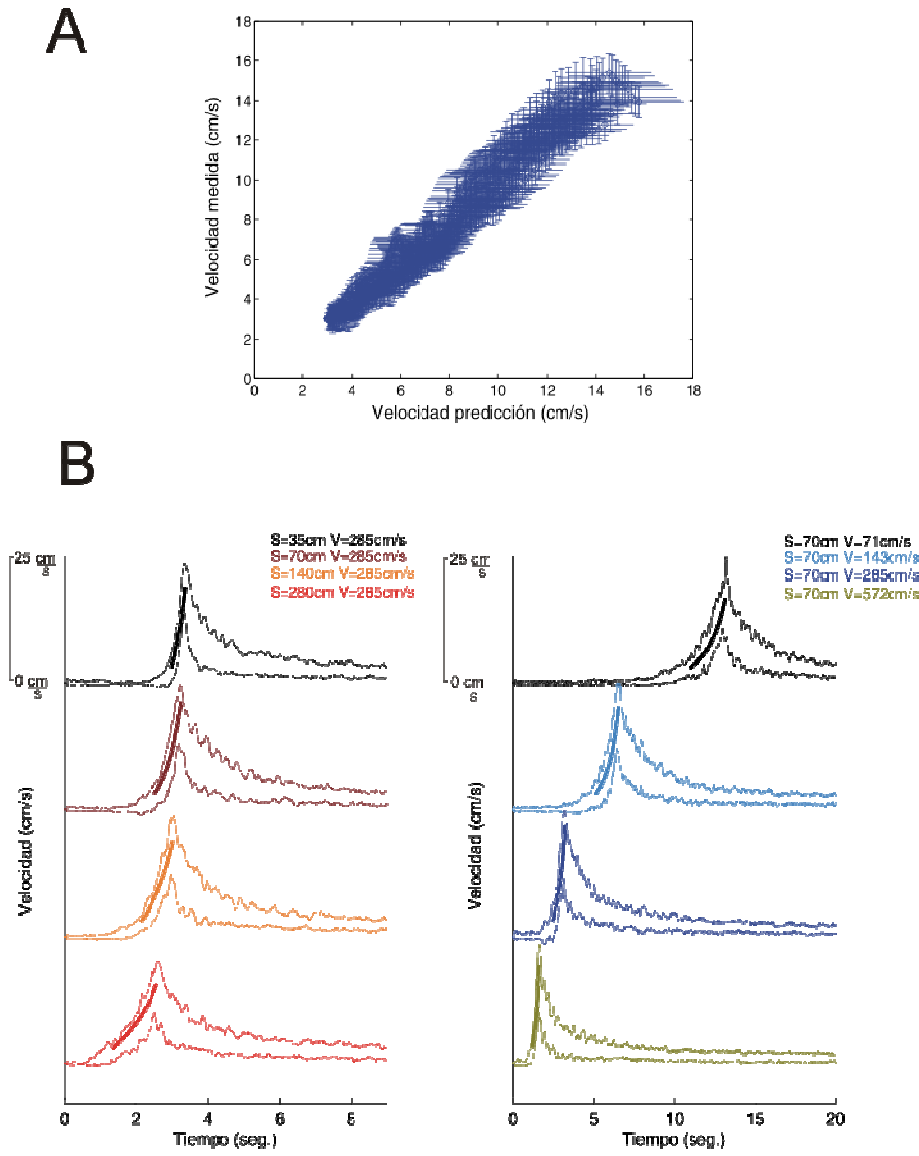
9) Una vez simulados con todos los valores de  $k$  y  $\tau$  propuestos. Elegir el valor del par  $(k, \tau)$  que minimiza  $E_{abs}(k, \tau)$

Este método se aplicó utilizando las funciones  $R(t - \delta)$  (ec. 5.2) para las neuronas MLG1, MLG2 y BGL1. Los parámetros de menor  $E_{abs}(k, \tau)$  para cada tipo neuronal se muestran en la tabla 6.1.

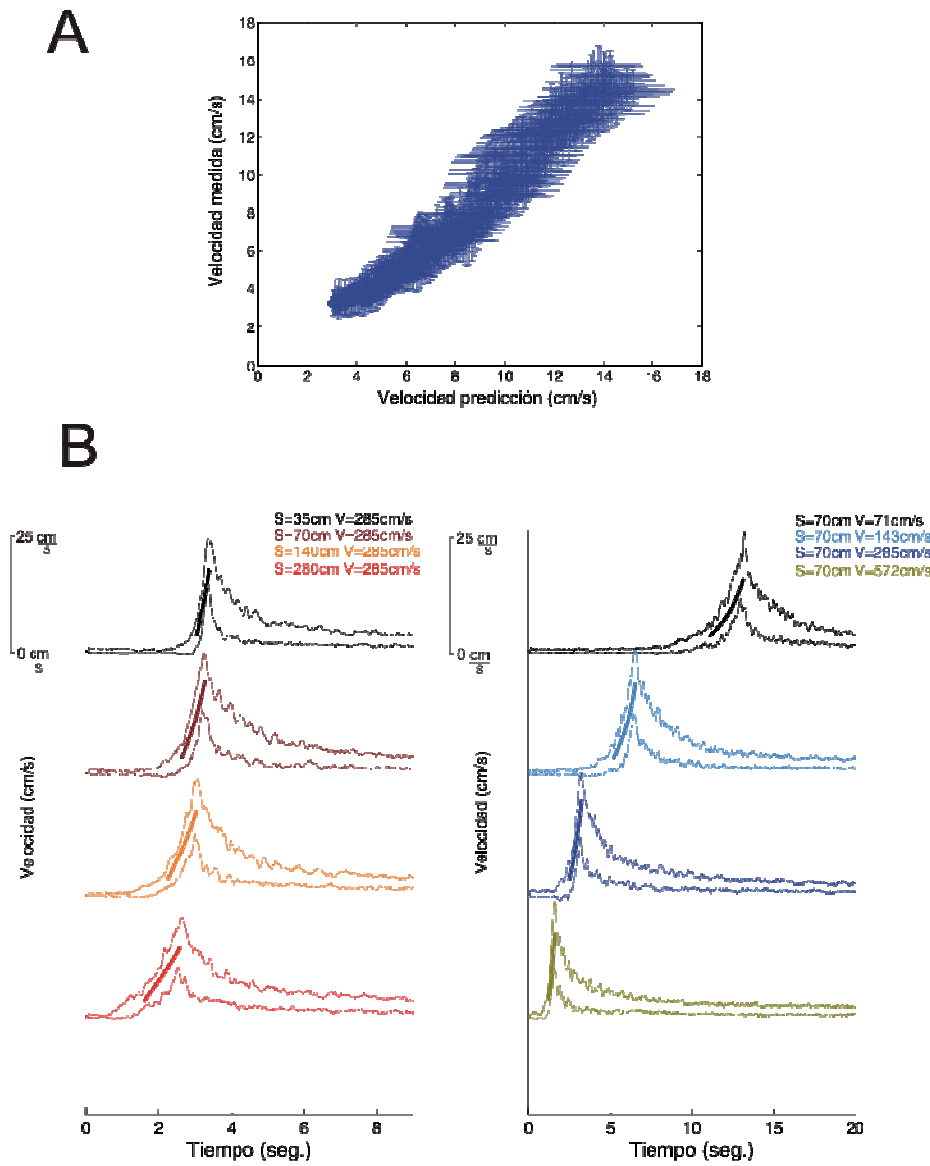
Tipo neuronal	k optimo (cm/seg)	$\tau$ optimo (seg)	$E_{abs}(k, \tau)$ (cm/seg)
MLG1	0.6	1.2	1.01±0.20
MLG2	1	0.6	1.08±0.15
BLG1	0.6	0.9	1.7±0.3

**Tabla 6.1: Errores de predicción del modelo de la ecuación 6.4 y los parámetros óptimos obtenidos para cada tipo neuronal.**

Finalmente en las figuras 6.9, 6.10 y 6.11 comparamos las velocidades medidas y las predicciones según el modelo propuesto por la ecuación 6.4 con los parámetros de la tabla 6.1. Como se puede apreciar, las predicciones de los modelos son satisfactorios para el caso de las neuronas MLG1 y MLG2, aunque no así para BLG1.

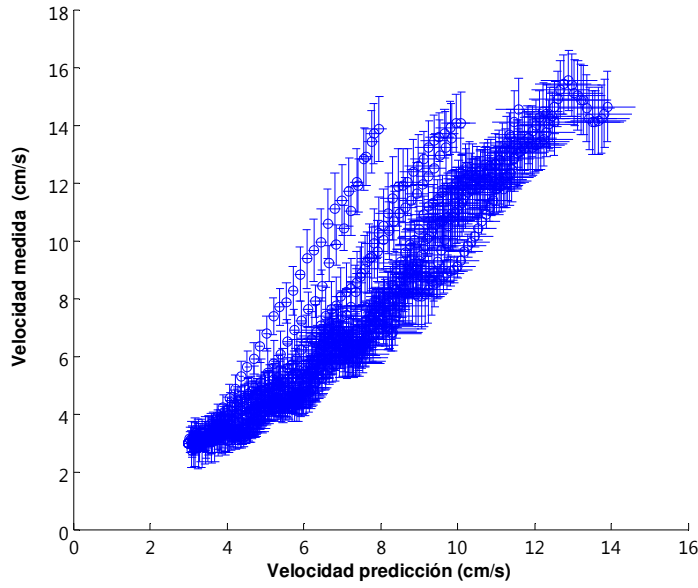


**Figura 6.9: Predicción de la velocidad de escape según el modelo de la ecuación 6.4 utilizando la tasa de disparo de las neuronas MLG1.** (A) Velocidad medida vs. velocidad predicha por el modelo de la ec. 6.4. Se hallaron los valores óptimos de  $k$  y  $\tau$  utilizando un método iterativo obteniéndose para la neurona MLG1 los valores  $k=0.6 \text{ cm/s}$  y  $\tau=1.2 \text{ s}$ . Las barras de error estándar verticales y horizontales se obtuvieron por el método de bootstrap (B) Velocidad medida (medias  $\pm$  desv. estándar) en función del tiempo para las 8 dinámicas de expansión. También se grafico la velocidad predicha por el modelo para velocidades mayores a 3 cm/s. La simulación se finalizó cuando termina la expansión.



**Figura 6.10: Predicción de la velocidad de escape según el modelo de la ecuación 6.4 utilizando la tasa de disparo de las neuronas MLG2.** (A) Velocidad medida vs. velocidad predicha por el modelo de la ec. 6.4. Se hallaron los valores óptimos de  $k$  y  $\tau$  utilizando un método iterativo obteniéndose para la neurona MLG1 los valores  $k=1\text{ cm/s}$  y  $\tau=0.6\text{ s}$ . Las barras de error estándar verticales y horizontales se obtuvieron por el método de bootstrap (B) Velocidad medida (medias  $\pm$  desv. estándar) en función del tiempo para las 8 dinámicas de expansión. También se graficó la velocidad predicha por el modelo para velocidades mayores a  $3\text{ cm/s}$ . La simulación se finalizó cuando termina la expansión.





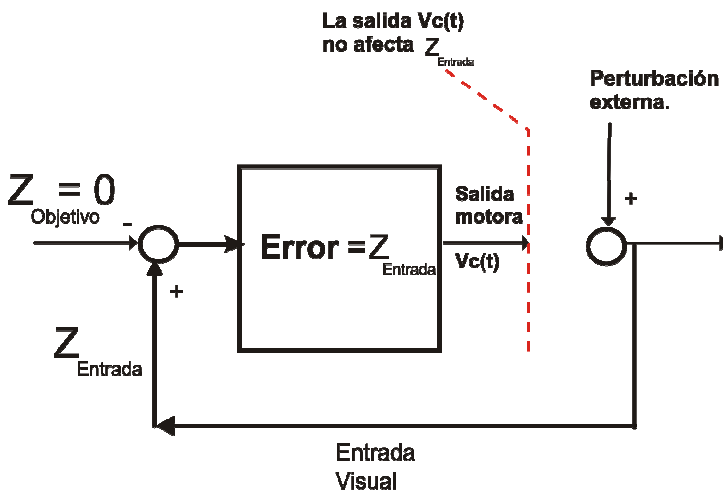
**Figura 6.11: Predicción de la velocidad de escape según el modelo de la ecuación 6.4 utilizando la tasa de disparo de las neuronas BLG1.** (A) Velocidad medida vs. velocidad predicha por el modelo de la ec. 6.4. Se hallaron los valores óptimos de  $k$  y  $\tau$  utilizando un método iterativo obteniéndose para la neurona MLG1 los valores  $k=0.9$  cm/s y  $\tau=0.6$  s. Las barra de error estándar verticales y horizontales se obtuvieron por el método de bootstrap. Las predicciones con el modelo usando la tasa de disparo de BLG1 no es tan bueno como en el caso de MLG1 o MLG2.

### 6.2.2- Interpretación del modelo de escape como un sistema de control.

En el capítulo 1 definimos los *Sistemas de respuesta controlada* en los que el animal posee una variable de error que mide la diferencia entre el valor de entrada  $Z_{Entrada}$  y el valor objetivo  $Z_{Objetivo}$  (ver figura 1.3.B). La salida motora del animal intenta disminuir el error. Para esto, compara continuamente el valor de entrada con el valor objetivo y computa un error. Además, pueden haber distintas perturbaciones externas al animal (por ejemplo por el movimiento del predador) que alteran el valor de entrada.

Los resultados obtenidos en los capítulos 5 y 6 pueden interpretarse del siguiente modo: en el caso de *Chasmagnathus*, la entrada está dada por ejemplo, por la tasa de disparo de la neurona MLG1, o sea  $Z_{Entrada} = R_{MLG1}$ , y el valor objetivo de  $Z$  en *Chasmagnathus* es  $Z_{Objetivo} = 0$ . De este modo, el error (ver figura 6.12) sería  $Error = Z_{Entrada} - Z_{Objetivo} = Z_{Entrada} - 0 = Z_{Entrada} = R_{MLG1}$ . Como vimos en el capítulo 5, la tasa de disparo de MLG1 es proporcional a la velocidad angular, por lo tanto, según esta interpretación, *Chasmagnathus* tiene por objetivo anular la velocidad angular del objeto que se aproxima (o lo que es lo mismo, mantener la distancia al mismo).

Es importante dejar en claro que esto es una interpretación de los resultados ya que en el dispositivo de medición el lazo de realimentación está abierto (ver figura 6.12). De este modo, el animal nunca puede alcanzar su objetivo, ya que sin importar su salida motora no puede contrarrestar el crecimiento constante con el que nosotros lo estimulamos. Sin embargo, esta interpretación es interesante por dos motivos: (1) genera predicciones claras para el comportamiento de *Chasmagnathus* ante otras dinámicas de aproximación (a lazo abierto o cerrado) que serán testeadas en el futuro y (2) permite analizar los experimentos en cangrejos con el mismo marco conceptual a los realizados en insectos.



**Figura 6.12: - Interpretación del modelo de escape como un sistema de control.** La línea punteada de color rojo muestra que en nuestro dispositivo de medición, la salida motora del animal no afecta la entrada visual  $Z_{Entrada}$  (mediciones a lazo abierto).

### 6.3- Resumen del modelo

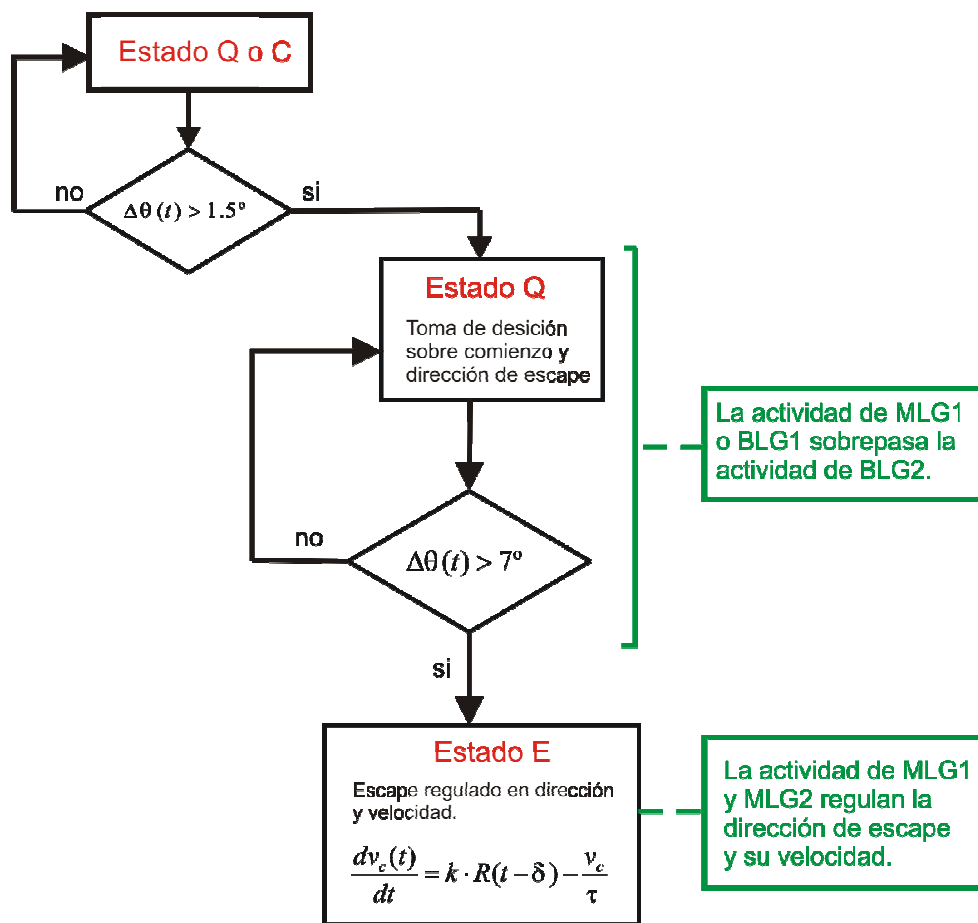
A partir de los resultados de este capítulo proponemos un modelo sobre la relación entre la actividad de algunas de las neuronas LG y el comportamiento de escape del cangrejo a los estímulos de colisión. Nos concentramos fundamentalmente en el comienzo del escape y la regulación de velocidad una vez comenzado el mismo (ver figura 6.13.A). En la figura 6.13.B mostramos tinciones intracelulares de las neuronas MLG1 y MLG2 y un esquema del circuito de las LG caracterizadas hasta el momento.

Antes de escapar, el animal se encuentra siempre en un estado de inmovilidad donde adquiere la información de las neuronas LG para decidir cuando y en que dirección escapar.

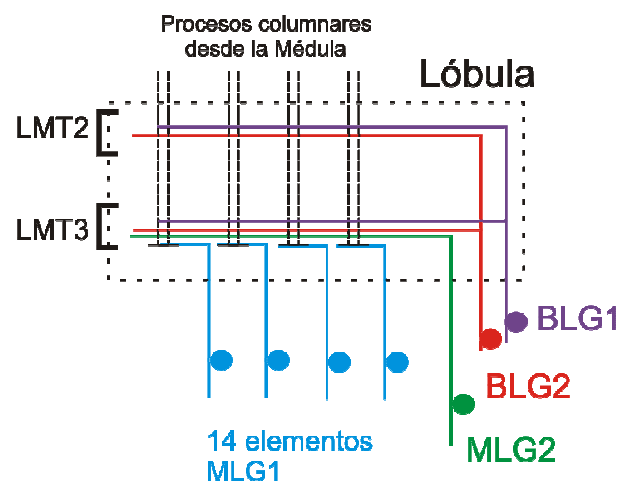
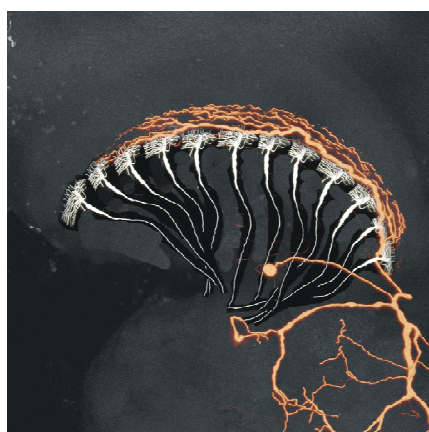
Comportamentalmente vimos que los animales comienzan el escape cuando el tamaño del objeto se incrementa en 7° y en este capítulo vimos que esta decisión puede deberse a un desbalance entre la actividad de las neuronas BGL1 o MLG1 y BLG2 (ver sección 6.1).

Por otro lado, una vez tomada la decisión de comenzar el escape, vimos que la velocidad media de los animales puede predecirse a partir de la actividad de las neuronas MLG1 y MLG2 (ver sección 6.2). Proponemos que las neuronas MLG1 (campo receptivo de 60°) codifican la dirección de acercamiento del objeto peligroso y esta información es utilizada para controlar la dirección de escape. Finalmente la actividad de las neuronas MLG1 y MLG2 (con amplio campo receptivo y homogéneo) podrían regular la velocidad de escape a través del modelo de la ec. 6.4.

A



B



**Figura 6.13: Modelo del comportamiento de *Chasmagnathus* a los estímulos de colisión y su posible implementación neuronal.** (A) Diagrama de flujo del comportamiento de *Chasmagnathus* a los estímulos de colisión y las posibles neuronas LG involucradas. (B) Tinciones intracelulares del arreglo de 14 neuronas MLG1 y la neurona MLG2 y al lado esquematizamos los resultados morfológicos principales de la tabla 1.4 (Medan et. al 2007).

## Conclusiones

- El cangrejo *Chasmagnathus* es un animal muy conveniente para estudiar cómo *la información visual controla la respuesta motora*. Podemos estudiar este problema tanto a nivel neuronal como comportamental.
- Para realizar los estudios comportamentales desarrollamos un dispositivo que mide la respuesta locomotora del animal cuando se aplican estímulos visuales generados por computadora. Con este dispositivo caracterizamos la respuesta de escape de *Chasmagnathus* a estímulos que simulan colisiones de objetos que se acercan al cangrejo a velocidad constante.
- Medimos la respuesta motora del animal variando distintos parámetros del estímulo como ser: la velocidad de aproximación, el tamaño del objeto, la dirección de acercamiento y el contraste respecto al fondo.
- Mostramos que la respuesta de escape a los estímulos de colisión es compleja y está compuesta por una secuencia de fases encadenadas. Las fases encontradas fueron: *Caminata*, *Quieto*, *Escape* y *Desaceleración*.
- Los animales que se encontraban inicialmente en el estado de *Caminata* (caminando en cualquier dirección a velocidad constante), se detienen (estado *Quieto o Freezing*) cuando detectan un foco de expansión en algún punto de su campo de visión. Esta transición se produce cuando el cuadrado en expansión se incrementa en  $1.5^\circ$  que es aproximadamente el valor del ángulo interommatidial.
- Comienzo del escape: Los animales deciden comenzar el escape cuando el tamaño angular del objeto se incrementa en  $7^\circ$ .
- La respuesta de escape es altamente direccional y la velocidad del animal es controlada instantáneamente por la entrada visual.
- Describimos la respuesta de las neuronas gigantes de la Lóbula (neuronas LG). Mostramos que las neuronas MLG1 y MLG2 (Monostratified Lóbula Giant Neuron 1 y 2) y BLG1 (Biestratified Lóbula Giant Neuron 1) de *Chasmagnathus*, responden preferencialmente a estímulos que representan colisiones de objetos y codifican la dinámica de expansión temporal de los estímulos. Mostramos que las tasas de disparo de MLG1 y BLG1 pueden predecirse como funciones de la velocidad angular del estímulo y en el caso de MLG2 como función de la aceleración angular. Por otro lado, las neuronas BLG2 (Biestratified Lóbula Giant Neuron 2), codifican una información cualitativamente distinta a las tres neuronas anteriores respondiendo principalmente el comienzo y la finalización de la expansión.

- Una vez medidas las respuestas comportamentales y neuronales, analizamos la posibilidad de predecir el comienzo del escape en función de la actividad de las neuronas LG y encontramos un criterio que usa información de dos neuronas que correlaciona con el mismo.
- Desarrollamos un modelo matemático simple que usando la tasa de disparo de las neuronas MLG1 o MLG2, predice satisfactoriamente la velocidad de los animales durante la fase de escape.
- Los resultados presentados en la tesis doctoral, basados en experimentos de respuesta neuronal y motora de *Chasmagnathus* a los estímulos de colisión, suman nuevas evidencias a favor de la hipótesis de que la respuesta motora del cangrejo está controlada por las neuronas LG (Tomsic et al. 2003).

## Discusión

Muchos de los descubrimientos importantes en las Neurociencias del siglo XX se realizaron utilizando invertebrados como animales de estudio. De estos estudios surgieron principios generales acerca del funcionamiento del sistema nervioso (Ramón y Cajal 1906, Hodgkin y Huxley 1952, Kandel, E. R. 2000).

Debido a que estos animales poseen sistemas nerviosos simples (comparado con los vertebrados), el estudio de sus circuitos neuronales y los comportamientos generados demostraron ser de gran utilidad en el avance de la Neurobiología. Como ejemplo, podemos citar las investigaciones sobre los sistemas visuales y motores en insectos, de donde surgió un área de investigación interdisciplinaria donde se conjuga el trabajo de biólogos, físicos e ingenieros (Reichardt 1986, Egelhaaf 2006, Gabbiani 2004, Perón y Gabbiani 2009). En esta línea de investigación se utiliza un enfoque *top-down* donde: a) Se comienza estudiando un comportamiento, b) se modelan fenomenológicamente los sistemas que lo regulan, c) se describen estos sistemas en términos de circuitos neuronales y d) se estudian los mecanismos biofísicos intrínsecos y de interacción de las neuronas en el circuito (Egelhaaf y Borst 1993). En el capítulo 1 repasamos algunos trabajos que abordan el funcionamiento de los sistemas de evitación de colisiones en los distintos niveles mencionados. También vimos, que en condiciones naturales, el comportamiento de un animal se produce por la interacción de muchos comportamientos simples que se encienden y apagan constantemente en función de las necesidades y situaciones que afronta el animal (Minsky M. 1986, Carew 2000). Un ejemplo de los muchos factores que afectan el comportamiento del cangrejo *Uca* fueron repasados en el capítulo 1 y como mostramos en el capítulo 3, algunos de ellos (por ejemplo el freezing) fueron observados en condiciones de laboratorio.

El enfoque de esta tesis consistió en estudiar los animales en condiciones de laboratorio con estímulos empobrecidos y esto nos permitió aislar el sistema de evitación de colisiones de *Chasmagnathus* para estudiarlo con mayor detalle y en condiciones reproducibles. El dispositivo que construimos (descrito en el capítulo 2) permitió cuantificar la respuesta del animal a los estímulos de colisión frente a distintos patrones visuales de estimulación. Este dispositivo posee la limitación de no realimentar la respuesta del animal a la dinámica del estímulo. Creemos que esta limitación no fue fundamental para la caracterización del sistema de escape ante estímulos de colisión, sin embargo en el futuro modificaremos el dispositivo para poder realimentar el movimiento del animal. Esto nos permitirá testear si efectivamente la respuesta de *Chasmagnathus* se puede describir por un sistema de control cuyo objetivo es anular la velocidad angular de la expansión (ver sección 6.2.2). Además la realimentación del movimiento del cangrejo, será útil

para caracterizar comportamientos como los de fijación y mecanismos de toma de decisión del animal (por ejemplo para el comienzo del escape). También puede darnos información sobre mecanismos de *visión activa*, o sea, cuanta información motora es utilizada en el procesamiento visual del animal. Para poder implementar fácilmente la realimentación motora en la estimulación visual simplificaremos el sistema de medición pasando de una esfera a un cilindro. Tenemos evidencias de que este cambio no afectará considerablemente las mediciones locomotoras cuando estimulemos lateralmente al animal ya que como mostramos en las figuras 3.2 y 3.9 el escape es altamente direccional.

#### *Comportamiento de escape en Chasmagnathus a los estímulos de colisión:*

*Regulación de velocidad:* El modelo de la ecuación 6.4 describe la velocidad del animal como una variable continua cuya evolución está controlada por una ecuación diferencial lineal y un forzado dado por la actividad neuronal de las neuronas MLG y predice satisfactoriamente la respuesta de *Chasmagnathus* a los estímulos aplicados para velocidades mayores a 3cm/s. A partir de este modelo pudimos hacer una interpretación simple en la cual el animal tiene como objetivo anular la velocidad de la expansión del cuadrado  $\dot{\theta}_{obj} = 0$  que está de acuerdo con los modelos de control motor en insectos repasados en el capítulo 1. Como dijimos, esta interpretación podrá estudiarse en detalle con el sistema de medición con realimentación mencionado anteriormente.

Por otro lado, este modelo es una aproximación debido a que los animales con patas generalmente producen transiciones en el patrón motor de sus miembros (llamadas transiciones de gait) (Collins and Richmond 1994, Golubinsky et al. 1999). Observaciones cualitativas sugieren que la respuesta de escape de *Chasmagnathus* también posee estas transiciones. Por ejemplo, en la figura 3.5 se ve que al finalizar la expansión del cuadrado, el animal se desacelera con dos tiempos característicos distintos y esto estaría asociado a dos patrones motores: uno asociado a la *corrida* (relajación rápida) para velocidades mayores a 4 cm/s y otro a la *caminata* (relajación lenta) para velocidades menores a 4cm/s.

Otro aspecto que estudiaremos sistemáticamente en el futuro, es la validez del modelo de la ec. 6.4 frente a otras dinámicas de expansión como por ejemplo expansiones con velocidad angular constante o expansiones oscilatorias. Este tipo de estímulos nos permitirá distinguir que variable óptica es más relevante para determinar la velocidad del animal, ya que como vimos en el capítulo 5 y 6, los errores de predicción con los modelos que dependen de la velocidad angular o aceleración angular son similares con los estímulos de aproximación a velocidad constante usados en esta tesis.



*Freezing y comienzo del escape:* Las mediciones sobre el freezing y el comienzo del escape en *Chasmagnathus* (unido a los trabajos de campo en *Uca*) muestran que la decisión de comenzar el escape es un proceso de toma de decisión complejo. En condiciones de laboratorio encontramos que estas transiciones pueden predecirse por un incremento angular: para el freezing de  $\Delta\theta_{freezing} \approx 1.5^\circ$  y para el escape  $\Delta\theta_{escape} \approx 7^\circ$ . El criterio para el comienzo del escape, está en acuerdo con los trabajos en crayfish (Glantz 1974) y en langosta (Fotowatt y Gabbiani 2007). Sin embargo, resulta interesante analizar la posibilidad de modular estos valores variando otras variables de la expansión y de este modo comprender mejor el mecanismo de toma de decisión para el comienzo del escape.

### *Codificación de las neuronas LG:*

Como mostramos en el capítulo 5, las mediciones neuronales de las neuronas LG muestran la utilidad de *Chasmagnathus* como modelo experimental para estudiar la codificación visual a los estímulos de colisión. Para las neuronas MLG1, MLG2 y BLG1, pudimos desarrollar un modelo simple que describe la tasa de disparo neuronal como una función estática de la velocidad o la aceleración angular (ec. 5.2). Utilizando esta información pudimos predecir satisfactoriamente la velocidad de los animales en la fase de escape. Sin embargo, en el futuro este modelo debe ser mejorado debido a las siguientes razones: **(1)** su validez es solo para estímulos de expansión y no puede extenderse a otros estímulos, por ejemplo contracciones, o movimientos de desplazamiento lateral. **(2)** como mostramos en el capítulo 5, la ecuación 5.2 es válida para incrementos angulares mayores a  $7^\circ$ , y no describe las respuestas fásicas de las neuronas observadas al comienzo de la expansión. **(3)** Existen evidencias de interacción entre los distintos tipos neuronales y **(4)** Algunas LG (ver tabla 1.4) también responden a estímulos mecánicos (Berón de Astrada y Tomsic 2002 y Medan et. al 2007).

Las limitaciones **(1)** y **(2)** requieren de estudios experimentales y de modelado para el procesamiento a nivel de una neurona. En este sentido, la respuesta de la neurona LGMD de la langosta es sin duda el modelo más estudiado, tanto a nivel fisiológico como de modelado y es llamativa la similitud morfológica (Medan et al. 2007) y de su respuesta con la de los tipos MLG1 y MLG2 de *Chasmagnathus* (Oliva et al. 2008). Una hipótesis de trabajo interesante sería que debido a la cercanía evolutiva y a la similitud en la actividad y morfología de ambos tipos neuronales, deben compartirse algunos principios de procesamiento. De este modo, el

conocimiento adquirido en el procesamiento visual de la LGMD puede ayudar en la descripción de las neuronas LG y viceversa.

Como discutimos en la sección 5.3.5, existe una controversia sobre el procesamiento de la LGMD que proviene fundamentalmente en determinar que propiedades de la computación de movimiento son sinápticas y cuales son intrínsecas de la membrana. En Gabbiani y Krapp (2006), se caracterizó en detalle el proceso de adaptación que parece generar las respuestas fásicas en la LGMD. En Perón y Gabbiani (2009), se mostró que este es un fenómeno intrínseco de la LGMD y muy importante para comprender la selectividad de la neurona LGMD a los estímulos de expansión por sobre otros estímulos visuales (por ejemplo movimientos laterales).

Como dijimos, además de las propiedades intrínsecas de las LG, tenemos las corrientes sinápticas que bajan columnarmente. La morfología de las LG, parece indicar una integración espacial de la información que baja retinotópicamente y sería muy interesante comprender que tipo de operaciones locales son sumadas por estas neuronas. Una fuente importante de información para el modelado de las LG puede provenir de experimentos electrofisiológicos intracelulares con estímulos pequeños y también de los experimentos de imaging que se están comenzando a realizar en nuestro grupo (Berón de Astrada, comunicación interna). A partir de estos datos se tendrá más información sobre las computaciones locales de movimiento que podrán introducirse en los modelos de las LG.

Respecto a la limitación (3), Medan (2008a) mostró a través de tinciones, la existencia de acoplamientos eléctricos entre estas neuronas y en esta tesis doctoral mostramos que las respuestas neuronales a los estímulos de colisión parecen mostrar una inhibición de las neuronas MLG o BLG1 hacia las neuronas BLG2 (ver figura 6.5). Consideramos que las interacciones neuronales entre las LG también son importantes en la dinámica de sus respuestas (fundamentalmente para el tipo BLG2). Estas observaciones, indican que para poder entender la codificación del ensamble de las neuronas LG, es necesario construir un modelo dinámico que tome en cuenta las interacciones entre ellas. Este interjuego entre la actividad de los distintos tipos neuronales podría tener consecuencias importantes en el comienzo del escape del animal (en la sección 6.1.2, mostramos que los animales comienzan su respuesta de escape cuando una función de la tasa de disparo de MLG1 o BLG1 sobrepasan la tasa de disparo de BLG2). Nuevamente existen antecedentes en el estudio de las corrientes sinápticas entre neuronas detectoras de movimiento del neuropilo llamado Lobula Plate de la mosca (Egelhaaf y Borst 1993, Egelhaaf 2006). En este animal, se encontraron neuronas que codifican movimientos horizontales y verticales de todo el campo visual y cumplen un rol fundamental en el control motor del vuelo. Estas neuronas son denominadas neuronas H, V y VCH (Egelhaaf 2006). También, se encontraron las neuronas FD que codifican el movimiento de

objetos pequeños y se cree que son utilizadas en los comportamientos de seguimiento de presas y parejas. Es importante destacar el alto grado de similitud entre la respuesta de las neuronas FD de la mosca y las neuronas BLG2 de *Chasmagnathus*, ya que los dos tipos neuronales codifican el movimiento de objetos pequeños y son inhibidas por neuronas detectoras de movimiento de campo receptivo amplio. En el caso de la mosca, la actividad de las neuronas detectoras de movimiento es moldeada por interacciones excitatorias e inhibitorias entre ellas. Por ejemplo, se mostró que la especificidad de las neuronas FD a los objetos pequeños proviene de la inhibición producida por la neurona VCH a través de sinapsis GABAérgicas (Egelhaaf 2006). Por otro lado muchas de las sinapsis excitatorias sobre las neuronas H son colinérgicas (Egelhaaf y Borst 1993). Otra fuente de información proviene de la neurona LGMD de la langosta donde se mostró que una de sus vías inhibitorias es a través de sinapsis GABAérgicas (Gabbiani et al. 2004). También obtendremos información sobre receptores sinápticos en las LG a partir de los mapas de receptores GABAérgicos y NMDA en *Chasmagnathus* que se están desarrollando en el LNBM (Pedreira, comunicación interna). Esta información sobre los posibles receptores en las LG también será de utilidad para agregar corrientes sinápticas plausibles a los modelos de neuronas únicas y así comenzar a modelar los procesos de interacción entre ellas.

Respecto a la limitación (4), en Berón de Astrada y Tomsic (2002) y Medan et. al (2007) se mostró que las neuronas MLG2, BLG1 y BLG2 responden a estímulos mecánicos en el cuerpo y las patas. En observaciones cualitativas realizadas durante el doctorado, observamos que cuando se mueven las patas, algunas LG responden en una dirección de movimiento. Esta codificación motora es interesante ya que podría implicar que algunas LG realicen cálculos complejos donde se evalúe el flujo óptico generado por el movimiento propio del animal y esto podría usarse para tener estimaciones de distancias y tamaños de los objetos alrededor al animal. Para estudiar experimentalmente la interacción entre el movimiento de las patas y la detección de movimiento se puede desplazar las patas y medir su velocidad, posición, etc con un acelerómetro pequeño. Este instrumento genera una tensión que puede ser adquirida sincronizadamente con la actividad neuronal.

#### *Relación entre la actividad de las neuronas LG y el escape en Chasmagnathus:*

Si bien estamos analizando un sistema biológico relativamente simple, el estudio del sistema de escape del cangrejo posee muchas de las limitaciones que encontramos en la descripción de cualquier sistema biológico: está regulado por muchas unidades de las cuales desconocemos detalles importantes de su construcción. Por lo tanto debemos ser cuidadosos, ya que dos variables

aleatorias que correlacionan no implica una relación causal entre ellas. Estas limitaciones hacen de la neuroetología una ciencia fuertemente experimental ya que cada experimento nos permite ir afinando la infinidad de modelos para describir los resultados.

En este sentido, una limitación de nuestro trabajo fue trabajar con correlaciones entre medias de actividad neuronal y comportamental. En el futuro es factible mejorar el estudio de la relación entre neuronas y comportamiento de dos maneras: (1) haciendo registros electromiográficos (Burrows y Hoyle 1973) sincronizados con los registros intracelulares y (2) haciendo registros extracelulares del nervio óptico mientras el animal mueve sus extremidades sobre la esfera. Este tipo de estudio se pudo realizar por ejemplo en la langosta y en el sapo (Carew 2000), y parecen factibles en el caso del cangrejo. Con el conocimiento que obtuvimos de los registros intracelulares, tal vez podamos reconocer los spikes que se medirán extracelularmente y midiendo el movimiento del animal, correlacionar la actividad neuronal y comportamental en animales individuales.

## Bibliografía

- Berón de Astrada, M., Sztarker, J. & Tomsic, D.** (2001) Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings in vivo. *J Comp Physiol [A]* **187**(1), 37-44.
- Berón de Astrada, M. & Tomsic, D.** (2002) Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura). *J Comp Physiol [A]* **188**(7), 539-51.
- Borst A, and Haag J.** (2002). Neural networks in the cockpit of the fly. *J Comp Physiol A* 188: 419,.
- Burrows, Hoyle (1973).** The mechanism of rapid running in ghost crab, *ocypode ceratophthalma*. JEB, 58, pag. 327-349.
- Carew T.** (2000). Behavioral Neurobiology. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- Collins and Richmond (1994)** - Hard-wired central pattern generators for quadrupedal locomotion- Biological Cybernetics, Volume 71, Number 5, pag. 375-385.
- Dickinson M.**, (2002). Sensory Fusion in Free-Flight Search Behavior of Fruit Flies. In: Neurotechnology for Biomimetic Robots (Eds. Ayers J.), The MIT Press, Cambridge. Pag 573-592.
- Egelhaaf M.**, (2006) The neural computation of visual motion information. In: Invertebrate vision (Eds. Warrant E., Nielsson D.E.), Cambridge University Press, Cambridge. Pag 399-461.
- Egelhaaf M., Borst A.** (1993). A look into the cockpit of the fly: Visual orientation, algorithms and identified neurons. *J. Neurosci.* 13, 4563-4574 (1993)
- Fotowat, H. & Gabbiani, F.** (2007) Relationship between the phases of sensory and motor activity during a looming-evoked multistage escape behavior. *J Neurosci* **27**(37), 1047-59.

- Gabbiani F** (2004). Multiplication and stimulus invariance in a looming-sensitive neuron, *Journal of Physiology - Paris* 98 (2004) 19–34
- Gabbiani F, Krapp HG, Laurent G** (1999) Computation of object approach by a wide field, motion-sensitive neuron. *J Neurosci* 19:1122–1141.
- Gabbiani F, Mo C, Laurent G** (2001) Invariance of angular threshold computation in a wide-field looming-sensitive neuron. *J Neurosci* 21:314 –329.
- Gabbiani F, Krapp HG, Koch C, Laurent G** (2002) Multiplicative computation in a visual neuron sensitive to looming. *Nature* 420:320 –324.
- Gabbiani F, Krapp HG, (2006).** Spike-frequency adaptation and intrinsic properties of an identified, looming-sensitive neuron. *J Neurophysiol*, 96, 2951-2962
- Glantz, R.M.** (1974) Defense reflex and motion detector responsiveness to approaching targets: the motion detector trigger to the defense reflex pathway. *J Comp Physiol* **95**, 297.
- Glantz RM.** Visual input and motor output of command interneurons of the defense reflex pathway in the crayfish.. En: *Arthropods*. Hoyh E Ed.. Plenum press, New York, págs. 1254-1274. (1977).
- Glantz RM & Barnes J. (2003).** Neural mechanism and Visual Behaviour. En: *Crustacen Experimental Systems*, Springer. págs. 203-226.
- Golubinsky, Stewart, Collins (1999).** Simetry in locomotor central pattern generators and animal gaits. *Nature*, **401**,693, pag 693-695.
- Hatsopoulos N, Gabbiani F, Laurent G** (1995) Elementary computation of object approach by wide-field visual neuron. *Science* 270:1000 –1003.
- Haag J, Theunissen F y Borst A.** The intrinsic electrophysiological characteristics of fly lobula plate tangential cells: II. Active membrane properties. *J Comput Neurosci*. 4(4):349-369. (1997).
- Hardie** (2006). . In: *Invertebrate vision* (Eds. Warrant E., Nielsson D.E.), Cambridge University Press, Cambridge. Pag 43-75
- Hodgkin y Huxley, 1952**, Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*, *Physiol. (Lond.)* 116: 473-496. (1952).
- Hemmi, JM & Zeil J** (2003) Robust judgement of inter-object distance by an arthropod. *Nature*, 421, 160-163
- Hertel, H., & Maronde, U.** (1988). Processing of visual information in the honeybee brain. In R. Menzel, & A. Mercer, *Neurobiology and behavior of honeybees* (pp. 141–157). Berlin: Springer.
- Horridge, G. A.** (1999b). Pattern vision of the honeybee (*Apis mellifera*): the effect of pattern on the discrimination of location. *Journal of Comparative Physiology, A*, 185, 105–113.
- Horridge A** (2000) Seven experiments on pattern vision of the honeybee, with a model. *Vision Research* 40 (2000) 2589–2603.

- Horridge A (2005)** What the honeybee sees: a review of the recognition system of *Apis mellifera*. *Physiological Entomology* (2005) 30, 2–13
- Kandel, E. R. (2000).** "The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialog Between Genes and Synapses." Nobel Lecture, December 8, 2000.
- Kelber A.** Invertebrate Color Vision. *Invertebrate Vision* . Cambridge Press, 250-290.
- Land, M. & Layne, J.E.** (1995a) The visual control of behaviour in fiddler crabs. I. Resolution, thresholds and the role of the horizon. *J Comp Physiol A* **177**, 81.
- Land, M. & Layne, J.E.** (1995b) The visual control of behaviour in fiddler crabs. II. Tracking control systems in courtship and defence. *J Comp Physiol A* **177**, 91.
- Land, M. & Nilsson.** (2006). General-purpose and Special-purpose Visual Systems. *Invertebrate Vision* . Cambridge Press, 250-290.
- Layne, J.E., Land, M. & Zeil, J.** (1997a) Fiddler crabs use the visual horizon to distinguish predators from conspecifics: a review of the evidence. *J Mar Biol Ass UK* **77**, 43.
- Laughlin, S.B.** (1994). Matching coding, circuits cells and molecules to signals : general principles of retinal design in the fly's eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, 13, 165–196.
- Lee, D. N.** (1976). A theory of visual control of braking based on information about time-to-collision. *Perception* **5**, 437-459.
- Lee, D.N.,** (1980) The optic flow field: the foundation of vision. *Phil. Trans R.Coc. Lond. B* **290**, 169-179.
- Maddess, T., Davey, M. P., & Yang, E. C.** (1998). Discrimination of complex textures by bees. *Journal of Comparative Physiology, A*, 184, 107–117.
- Medan V., Oliva D., Tomsic, D.** (2007) An assemblage of movement sensitive neurons that may participate in object tracking and the directional tuning of the escape response to visual stimuli in crabs. International Society for Neuroethology Meeting, Vancouver, Canada 2007.
- Medan V.,** (2008a). Tesis doctoral - Universidad de Buenos Aires.
- Medan, Oliva, Tomsic (2008b).** Directional escape responses to visual stimuli: retinotopic organization and response properties of Lobula Giant neurons in the crab *Chasmagnathus*. Poster Society for Neuroscience.
- Minsky M.,** La sociedad de la mente. Editorial Grijalva. 1986.
- Molinas J, Oliva D, Tomsic D.** Elección de dirección de escape ante estímulos de colisión en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Primera Reunion Conjunta de Neurociencias. Huerta Grande, Cordoba 2009.
- Nalbach** (1990). Visual elicited escape in crabs. *Frontiers in crustacean neurobiology*. Birkhauser Verlag Basel, 165-174.
- O'Carroll, D.** (1993) Feature-detecting neurons in dragonflies. *Nature* **362**(6420), 541-543.
- O'Carroll, D.C., Bidwell, N.J., Laughlin, S.B. & Warrant, E.J.** (1996) Insect motion detectors matched to visual ecology. *Nature* **382**, 63.
- Osorio, D.** (1987a). Temporal and spectral properties of sustaining cells in the medulla of the locust. *Journal of Comparative Physiology, A*, 161, 441–448.

- Osorio, D.** (1987b). The temporal properties of non-linear transient cells in the locust medulla. *Journal of Comparative Physiology, A*, 161, 431–440.
- O'Shea, M. and Williams, J.L.D.** (1974) *J. Comp. Physiol.* 91, 257–266.
- Peron SP, Gabbiani F,(2009)** Spike frequency adaptation mediates looming stimulus selectivity in a collision-detecting neuron. *Nat Neurosci.* 12, 318-326
- Preuss T, Osei-Bonsu PE, Weiss SA, Wang C, Faber DS** (2006) Neural representation of object approach in a decision-making motor circuit. *J Neurosci.* 26:3454 –3464.
- Ramón y Cajal (1906)**, Ramón y Cajal S. The structure and connexions of neurons. En Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1901–1921). (Amsterdam Elsevier) (1967) pag. 220-253 (1906).
- Reichardt, W,** (1986) Processing of optical information by the visual system of the fly . *Vision Research* 26, pp. 113–126.
- Reichardt, W.E. and T. Poggio** (1977): Visual control of orientation behaviour in the fly. Part I. A quantitative analysis. *Quart. Rev. Biophysics* **9(3)**, 311-375.
- Rind, C.F.** (1989) Identification of directionally selective motion-detecting neurones in the locust lobula and their synaptic connections with an identified descending neurone. *J Experimental Biology* (149), 21.
- Rind, F.C. and Bramwell, D.I.** (1996) *J. Neurophysiol.* 75, 967–985. Neural network based on the input organization of an identified neuron signaling impending collision.
- Rind, F.C.** (2002) Motion detectors in the locust visual system: From biology to robot sensors. *Microsc Res Tech* **56(4)**, 256-69.
- Rind, F.C. & Santer, R.D.** (2004) Collision avoidance and a looming sensitive neuron: size matters but biggest is not necessarily best. *Proc Biol Sci* **271 Suppl 3**, S27-9.
- Rind, F.C. & Simmons, P.J.** (1999) Seeing what is coming: building collision-sensitive neurones. *Trends Neurosci* **22(5)**, 215-20.
- Ruffier F. y Franceschini N.** (2005) Optic flow regulation: the key to aircraft automatic regulation. *Robotics & Autonomous systems* **50**, 177-194.
- Srinivasan et.al** (2000), How honeybee make grazing landing on a flat surface. *Biol. Cybernetics*.
- Srinivasan et.al.,** (2002). Visual Flight Control and Navigation in Honeybees: Applications to Robotics . In: *Neurotechnology for Biomimetic Robots* (Eds. Ayers J.), The MIT Press, Cambridge. Pag 593.
- Srinivasan et.al** (2006). Small brains Smart Minds: Vision, Perception, Navigation and Cognition in insects. *Invertebrate Vision*. Cambridge Press, 462-492.
- Sztarker, J.** (2006) Organización neuroanatómica y funcional de neuronas involucradas en diferentes aspectos del aprendizaje visual de *Chasmagnathus*. In *Dept. de Fisiología, Biología Molecular y Celular*, Vol. Doctoral, p. 112. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Sztarker, J., Strausfeld, N.J. & Tomsic, D.** (2005) Organization of optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab. *J Comp Neurol* **493(3)**, 396.
- Sztarker, J. & Tomsic, D.** (2004) Binocular visual integration in the crustacean nervous system. *J Comp Physiol [A]* **190(11)**, 951.

- Sztarker, J. & Tomsic, D.** (2008) Neuronal correlates of the visually elicited escape response of the crab *Chasmagnathus* upon seasonal variations, stimuli changes and perceptual alterations. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **194**(6), 587-96.
- Strausfeld N.J., A.D. Blest,** (1971) , The optic lobes of Lepidoptera, Philos. Trans. R. Soc. London 258 81–134.
- Strausfeld N.J., D.R. Naessel,** (1981) Neuroarchitecture serving compound eyes of crustacea and insects, in: H. Autrum (Ed.), Comparative Physiology and Evolution of Vision of Invertebrates. B: Invertebrate Visual Centers and Behavior I. Handbook of Sensory Physiology, vol. VII/6B, Springer-Verlag, Berlin, ,pp. 1–132.
- F. Ruffier, N. Franceschini** (2005) Optic flow regulation: The key to aircraft automatic guidance. *Robotic and Autonomous Systems*. Vol. 50, Issue 4. March 2005 ,pp. 177–194.
- Sun, B.J. Frost,** (1998) , Computation of different optical variables of looming objects in pigeon nucleus rotundus neurons, *Nat. Neurosci.* 1 296–303.
- Tammero, L. F. and Dickinson, M. H.** (2002). Collision-avoidance and landing responses are mediated by separate pathways in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **2005**, 2785-2798.
- Tomsic, D., Berón de Astrada, M. & Sztarker, J.** (2003) Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. *J Neurosci* **23**(24), 8539-46.
- Wang Y, Frost B. J.** 1992. Time to collision is signalled by neurons in the nucleus rotundus of pigeons. *Nature*, 356, 236-238
- Wasserman L.** (2004) All of Statistics. A concise course in Statistical inference. Springer. Capítulo 8. pag.107.
- Wehner , Labhart** (2006). Polarization Vision. *Invertebrate Vision*. Cambridge Press, 291-348.
- Yang, E.-C., & Maddess, T.** (1997). Orientation-sensitive neurons in the brain of the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 43, 329–336.
- Zeil, J. & Al-Mutairi, M.** (1996) The variation of resolution and of ommatidial dimensions in the compound eyes of the fiddler crab *Uca lactea annulipes* (Ocypodidae, Brachyura, Decapoda). *J Exp Biol* **199**(Pt 7), 1569-77.
- Zeil, J. & Hemmi, J.M.** (2006) The visual ecology of fiddler crabs. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **192**(1), 1-25.